

UNTERSUCHUNGEN
ZU VERÄNDERUNGEN
DER HÄMOSTASE
BEI GESUNDEN BLUTSPENDERN
DURCH KONTINUIERLICHE
BLUTZELLSEPARATION

Eduard Heitmeier

Aus der Medizinischen Klinik III der Universität München
Direktor: Professor Dr. W. Wilmanns

UNTERSUCHUNGEN ZU VERÄNDERUNGEN DER HÄMOSTASE
BEI GESUNDEN BLUTSPENDERN
DURCH KONTINUIERLICHE BLUTZELLSEPARATION

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Eduard Heitmeier
aus München

München 1986

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. E. Hiller

Mitberichterstatter: Prof. Dr. W. Wilmanns

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 27. 5. 1986

DISSERTATIONS- UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

Abkürzungen:

ACD	acid citrate dextrose (Antikoagulans)
ACT	activated coagulation time
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
AT III	Antithrombin III
ATP	Adenosintriphosphat
BRK	Bayerisches Rotes Kreuz
BZS	Blutzellseparator, Blutzellseparation
c-AMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CFC	continuous flow centrifugation
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
ESM	Erythrozytensedimentationsmittel
F-CB 3	Zyanbromidbruchstück des Fibrinogen
FL	Filtrationsleukopherese
FSP	Fibrin(ogen)spaltprodukte
HÄS	Hydroxyäthylstärke (ESM)
IFC	intermittend flow centrifugation
LFMK	Lösliche Fibrinmonomerkomplexe
LP	Leukozytopherese
LS	Leukozytenstimulation
NCI	National Cancer Institute
PF 3, 4	Plättchenfaktor
PG I ₂ , H ₂	Prostaglandin (PG I ₂ = Prostacyclin)
PL	Phospholipide
PT	Prothrombinzeit, Quick, Thromboplastinzeit
PTT	Partielle Thromboplastinzeit
PTZ	Plasmathrombinzeit, Thrombinzeit
ß-TBG	ß-Thromboglobulin
TP	Thrombozytopherese
TX A ₂ , B ₂	Thromboxan

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. Einleitung	3
1.1. Historischer Überblick	3
1.2. Bisherige Erfahrungen	7
1.3. Das System der Hämostase	19
1.4. Grenzen und Möglichkeiten hämostaseologischer Untersuchungen bei Blutzellseparation	14
2. Zielsetzung	19
3. Material und Methoden	21
3.1. Material	21
3.1.1. Spender	21
3.1.2. Ort der Untersuchung	21
3.1.3. Blutzellseparation mit dem IBM 2997 blood processor im BRK-Blutspendedienst München	23
3.1.4. Gewinnung und Präparation des Untersuchungsmaterials	28
3.2. Methoden	30
3.2.1. Zellzählung	30
3.2.2. Gesamteiweiß	30
3.2.3. Antithrombin III (immunologisch und funktionell)	30
3.2.4. Fibrinogen	34
3.2.5. Lösliche Fibrinmonomerkomplexe	34
3.2.6. Plasminogen (immunologisch und funktionell)	36
3.2.7. Fibrinogen- und Fibrin-Spaltprodukte	36
3.2.8. F-CB 3 verwandtes Antigen	37
3.2.9. Thromboxan B ₂	38
3.3. Auswertung	43

	Seite
4. Ergebnisse	44
4.1. Konzentratausbeute und Volumenbilanz	44
4.2. Blutbild	48
4.2.1. Erythrozyten	48
4.2.2. Leukozyten	48
4.2.3. Thrombozyten	48
4.3. Plasmatische Gerinnungsaktivität	50
4.3.1. Antithrombin III	50
4.3.2. Fibrinogen	53
4.3.3. Lösliche Fibrinmonomerkomplexe	53
4.4. Fibrinolytische Aktivität	56
4.4.1. Plasminogen	56
4.4.2. Fibrin(ogen)spaltprodukte	59
4.4.3. F-CB 3 verwandtes Antigen	59
4.5. Thrombozytenaktivierung - Thromboxan B ₂	59
4.6. Unspezifische Konzentrationsänderung - Gesamteiweiß	61
5. Diskussion	68
5.1. Blutbild	68
5.1.1. Erythrozyten	68
5.1.2. Leukozyten	69
5.1.3. Thrombozyten	69
5.2. Plasmatische Gerinnungsaktivität	70
5.3. Fibrinolytische Aktivität	72
5.4. Thrombozytenaktivierung	72
6. Zusammenfassung	76
7. Literaturverzeichnis	78

1. EINLEITUNG

1.1 Historischer Überblick

Thrombozytentransfusionen finden heute eine breite klinische Anwendung in vielen Fällen einer durch Thrombozytopenie oder Thrombozytenfunktionsstörung bedingten Blutungsneigung oder Blutung. In wesentlich geringerem Maße kommt die Granulozytentransfusion zum Einsatz. Unter den Indikationen sind am häufigsten vertreten Thrombopenien und Neutropenien bei zytostatisch behandelten Leukämien. Dabei ist der Wert insbesondere der Plättchentransfusionen in mehreren Studien belegt (26,10,30). Die Granulozytentransfusion ist zwar prinzipiell sinnvoll und erfolgversprechend (3,24,34,39,83), findet jedoch in letzter Zeit wesentlich seltener Anwendung, da es kaum möglich ist, die für einen therapeutischen Erfolg notwendigen Mengen zu transfundieren.

Bis in die 50er Jahre war der Begriff Bluttransfusion immer gleichbedeutend mit Vollbluttransfusion. Erst zu dieser Zeit begann man, zunächst nur in Hinsicht auf Thrombozyten, aus dem Spenderblut gezielt eine Zellart abzutrennen und diese dem Empfänger zu transfundieren. Die Auftrennung der einzelnen Zellarten erreichte man mit dem noch heute angewandten Prinzip der Differentialzentrifugation. In den 60er Jahren brachte es der erhöhte klinische Bedarf der Thrombozytentransfusion mit sich, daß die bisherige Methode, die immer mit einer Vollblutspende verbunden war, die Versorgung nicht mehr gewährleisten konnte. Zudem war man bei dieser Methode gezwungen, wegen der geringen Thrombozytenmenge, die man aus einer Vollblutspende gewinnen konnte, einen Pool von meist vier Spendern zu bilden. Dies führte zwangsläufig zur vermehrten Übertragung von Antigenen mit der zunehmenden Gefahr nachfolgender immunologisch bedingter Refraktärität gegen weitere Transfusionen. So entwickelte man das Verfahren, das heute unter dem Begriff Zytophe-

rese verstanden wird und das besagt, daß dem gespendeten Vollblut eine Zellart (z.B. Thrombozyten oder Leukozyten) entzogen und der Rest dem Spender zurückgegeben wird. Auf diese Weise gewinnt man große Mengen an Spenderzellen ohne wesentliche Entblutung, so daß ein Spender intensiver und häufiger herangezogen werden kann.

Man verwendete dazu zunächst ein Mehrfach-Beutel-System: Drei bis vier dicht miteinander verbundene Plastikbehälter erlauben die aseptische Auftrennung der Blutkomponenten durch sequentielle Zentrifugationsschritte, wobei die in dem ersten Beutel enthaltenen Erythrozyten dem Spender wieder zurückgegeben werden.

Der Effekt der Leukozytensammlung mit diesem Verfahren war jedoch gering, da man nur ungenügende Leukozytenmengen gewinnen konnte. Man wick deshalb anfänglich auf Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie als Blutspender aus (63).

Offensichtliche Nachteile dieser Methode trieben Entwicklungen voran, größere Mengen normaler Leukozyten von einem Spender zu gewinnen:

1965 wurde der erste Blutzellseparator (BZS) vorgestellt, den Freireich in Zusammenarbeit mit dem National Cancer Institute (NCI) und der IBM-Corporation entwickelt hatte (17). Mit diesem Gerät konnte man das Prinzip der Zytopherese nicht nur auf Thrombozyten, sondern auch auf Leukozyten anwenden. Auf die Anwendungsweise des Blutzellseparators soll später noch genauer eingegangen werden.

1970 stellte Djerassi (11) ein völlig andersartiges Prinzip der Zytopherese vor, die nur auf Leukozyten anwendbare Filtrationsleukopherese: Spenderblut wird durch Nylonwolle enthaltende Filter geleitet. Dabei haften Granulozyten, Monozyten und einige Thrombozyten an den Nylonfasern, während die übrigen Blutbestandteile zum Spender zurückfließen. Nach der Separation werden die haften- den Zellen durch Kalziumchelatbildner wie EDTA-Elektro-

lytlösungen oder ACD-Plasma-Elektrolytlösungen eluiert.

Roy 1970 (72), McCredie 1971 (53), Mishler 1974 (58) zeigten, daß bei Blutzellseparation (BSZ) im Blutzellseparator durch den Einsatz von Erythrozytensedimentationsmitteln wie Hydroxyäthylstärke oder hochmolekulares Dextran wesentlich höhere Leukozytenausbeuten erreicht werden können.

Zur gleichen Zeit begann man durch Spenderkonditionierung mittels Gabe von Stimulantien den Anteil zirkulierender Granulozyten (Kortikosteroide, Ätiocholanolon) bzw. Thrombozyten (Epinephrin) im Spender zu steigern und die Ausbeute dadurch nochmals zu erhöhen (54,69,65, 59,7).

Heute stehen vor allem zwei Zytophereseverfahren unter folgenden Gesichtspunkten zur Verfügung (Tab. 1):

1) Reversible Leukozytenadhärenz

Filtrationsleukopherese (FL)

2) Zentrifugation / Sedimentation

kontinuierliche Zentrifugation (CFC)

Aminco/IBM, Fenwal Celltrifuge II,
IBM 2997, Fenwal CS 3000

intermittierende Zentrifugation (IFC)

Haemonetics 30, Bellco Progress

Tab.1 Zytophereseverfahren

Zu 1) die schon erwähnte Filtrationsleukopherese:

Sie ist günstig in der Anschaffung, einfach in der Handhabung, hat eine hohe Granulozytenausbeute und eine geringe Fremdzellbeimengung, wodurch eine ABO-unabhängige Transfusion möglich ist. Nachteilig wirken sich jedoch das geringe Anwendungsspektrum (keine Thrombozytenkonzentrate), die erhöhte Incidenz an Spenderreaktionen (15,32,86) und der hohe Anteil funktionsgestörter Granulozyten aus (57,33,28).

Zu 2) die Zytopherese durch Blutzellseparatoren nach

dem Prinzip der Zentrifugation und Sedimentation:

Als Nachteile stehen vor allem der hohe Anschaffungspreis und die Notwendigkeit des Einsatzes von Erythrozytensedimentationsmitteln (ESM) und eventuell Leukozytenstimulantien (LS) im Vordergrund. Zusätzlich besteht bei ihnen durch den hohen T-Lymphozytenanteil die Gefahr der Graft-versus-host-Reaktion, zu deren Vermeidung nötigenfalls eine Bestrahlung der gespendeten Zellen durchgeführt werden muß. Dagegen weisen sie ein breites Anwendungsspektrum (Thrombo-, Leuko-, Plasmapherese) und eine sehr schonende Zellgewinnung auf (57).

Ein Teil der Blutzellseparatoren arbeitet mit intermittierendem Blutdurchfluß (IFC: Haemonetics Model 30, Progress). Die dadurch bedingten Volumenschwankungen und das bei diesem Verfahren große extrakorporale Volumen führen manchmal zu unerwünschten Spenderreaktionen (41). Zusätzlich weist das mit der IFC-Methode gewonnene Granulozytenkonzentrat einen hohen Erythrozyten- und Thrombozytenanteil auf, der zu einem unerwünscht hohen Verlust beim Spender (23) und eventuell zum Auftreten einer ABO-Inkompatibilität führt. Diese Nachteile treten bei den mit kontinuierlichem Blutdurchfluß arbeitenden Blutzellseparatoren (CFC: Aminco/IBM,

IBM 2997, Fenwal Celltrifuge II, Fenwal CS 3000) nicht oder in geringerem Maße auf. Da sich zudem mit der CFC-Methode größere Zellmengen gewinnen lassen, hat sich in den letzten Jahren diese Methode durchgesetzt und findet häufige Anwendung. So führte der Blutspendedienst des BRK in München 1977 183 Zellseparationen und im Jahre 1982 891 Zellseparationen durch, die letzteren fast ausschließlich mit Maschinen vom Typ der CFC (IBM blood processor 2997, Fenwal CS 3000).

1.2 Bisherige Erfahrungen

Da es sich bei den Spendern in den allermeisten Fällen um gesunde Personen handelt, muß angesichts der häufig wechselnden Separationsverfahren immer wieder neu ganz besonderes Augenmerk auf eine mögliche Gefährdung der Spender gerichtet werden, wobei unter anderem die Möglichkeit einer Aktivierung des Hämostasesystems zu beachten ist. Die Wichtigkeit dieser Frage erklärt sich auch durch die vor allem in den Anfangsjahren aufgetretenen Komplikationen.

Moriau (62) berichtet, daß bei wiederholter Leukopherese identischer Spender in kurzen Intervallen mit dem NCI-IBM-Blutzellseparator häufig ein akutes Lungenstechen mit retrosternalem oder intercostalem Schmerz, Schwitzen, Blutdruckabfall und Tachycardie aufgetreten sei, dessen Ursache Lungenembolien durch Thromben aus dem Blutzellseparator waren.

Auch eine Reihe anderer Autoren berichteten über das Auftreten von thrombotischen Mikroemboli teilweise mit klinischen Symptomen wie Atembeschwerden (62).

Drescher (12) beobachtete bei einer Leukopherese mit dem Blutzellseparator "Hämonetics Model 30" das Auftreten eines großen Fibringerinnsels im Plasmabeutel. Bei

weiterer Inspektion stellte er fest, daß das Blut in der Zentrifugentrommel vollständig geronnen war.

Kretschmer (47) sah bei hohen Zentrifugendrehzahlen multiple Thrombozytenaggregate im Zentrifugenbecher der CFC-Aminco-IBM-Maschine. Dieselbe Beobachtung machte er in der Zentrifugenglocke der IFC-Maschine (Haemonetics). In 4 Fällen konnte sogar das Blut infolge mehr oder weniger starker Gerinnung trotz regulärer Antikoagulation nicht retransfundiert werden.

Howard (40) beobachtete während einer IFC-Thrombopherese mit dem Haemonetics M 30 eine massive Hämolyse, wahrscheinlich bedingt durch einen Knick oder Verdrillung eines blutführenden Schlauches.

Möglicherweise sind andere, vereinzelt mitgeteilte Komplikationen, deren Ursachen unklar sind, auch durch Gerinnungsstörungen verursacht.

In der Literatur findet man nur wenige Mitteilungen, die sich mit dem Thema möglicher Hämostaseveränderungen durch BZS befassen.

Moriau et al. (62) führten Leukopheresen mit dem NCI-IBM-blood cell processor (CFC) durch und sahen bei Wiederholungsspenden starke Veränderungen der Gerinnungsparameter mit deutlichen Hinweisen auf abgelaufene Gerinnungsvorgänge.

Reich (71) konnte in 1 von 100 Leukopheresen FSP beim Spender feststellen.

Von Wysk et al. (88) wurden bei Thrombopheresen mit der CFC-Methode (Aminco) deutliche Verminderungen des Fibrinogens und der Faktoren V, VIII und X im Sinne der Gerinnungsaktivierung im extracorporalen Kreislauf nachgewiesen; gleichsinnig, aber geringer beim Spender.

Farrales et al. (14) untersuchten nach Leukopheresen mit CFC (Aminco-Celltrifuge) die Thrombozytenadhäsivität und -aggregation. Aufgrund ihrer Ergebnisse bewerteten sie die Plättchenfunktion als unbeeinflusst.

Gail (18) jedoch fand bei IFC-Thrombopheresen (Haemonetics M 30) ausgeprägte Veränderungen der Thrombozytenaggregation.

Kisker et al. (46) führten eine Untersuchung mit dem BZS Haemonetics M 30 durch. Sie sahen zum Teil signifikante Konzentrationsänderungen von Gerinnungsfaktoren und Blutplättchen, verbunden mit gleichsinnigen Veränderungen der Gerinnungszeiten. Sie bewerteten diese als zu gering, um daraus eine Gefährdung für den Spender ableiten zu müssen.

Maguire et al. (50) verglichen den Einfluß der IFC-Leukopherese (Haemonetics M 30) auf die Thrombozytenaggregation mit und ohne Verwendung von HÄS. Insgesamt schlossen sie, daß keine Funktionsveränderung zu erkennen sei.

In mehreren anderen Arbeiten tauchen Gerinnungsuntersuchungen nur am Rande auf (Huestis (42), McCullough (56), Ruder (73), Hester (36), McCredie (55), Sussman (79), Mishler (60)). Sie konstatieren alle den zu erwartenden Thrombozytenabfall beim Spender und je nach angewandter Antikoagulationsmethode veränderte und unveränderte Gerinnungszeiten.

1.3. Das System der Hämostase

Die Hämostase ist eine funktionelle Einheit von vier Systemen: Blutgefäße, Thrombozyten, plasmatische Gerinnung und Fibrinolyse (Abb. 1, 2, 3).

Nach Verletzung eines Blutgefäßes kommt es neben der reflektorischen Kontraktion des betroffenen Gefäßes auch zur Freisetzung von Gewebsthromboplastin und Gewebsaktivatoren, wodurch die plasmatische Gerinnung und die Fibrinolyse über den sogenannten Extrinsic-Weg in Gang gesetzt wird. Zusätzlich erfolgt über freigelegte Gefäßwandstrukturen wie das Kollagen der Basalmembran

eine Aktivierung der Thrombozyten, sowie der plasmatischen Gerinnung und der Fibrinolyse über den sogenannten Intrinsic-Weg. Die gesunde Gefäßwand hingegen wirkt durch ihren speziellen Aufbau nicht aktivierend, wobei vom Gefäßendothel abgegebene Stoffe (Prostazyklin) auf Thrombozyten zusätzlich antiaggregatorisch und desaggregierend wirken.

Die Thrombozyten interferieren von zwei Seiten mit dem Blutgerinnungsvorgang. Erstens durch Kontakt mit Fremdoberflächen, wobei als fremd prinzipiell jede vom Gefäßendothel abweichende Struktur gilt, manche jedoch eine besonders stark aktivierende Potenz haben wie z.B. das Gefäßwandkollagen. Zweitens über gelöste aktivierende Substanzen, worunter das bei der plasmatischen Gerinnung gebildete Thrombin und das von anderen Thrombozyten freigesetzte ADP und Thromboxan wohl die wichtigsten sind. Die Thrombozyten reagieren durch Adhäsion an Fremdoberflächen, Aggregation untereinander und die Freisetzungsreaktion, wobei Substanzen mit Einfluß auf andere Thrombozyten (ADP, Thromboxan), auf die plasmatische Gerinnung (PF 3, Faktor XI-Aktivatoren) und auf die Gerinnselretraktion (Thrombostenine) verfügbar werden.

Die plasmatische Gerinnung wird in Gang gesetzt in einem endogenen Weg durch Kontakt mit Fremdoberflächen (Faktor XII) oder durch Thrombozyten (Faktor XI) und in einem exogenen Weg durch bei Gefäßwandverletzung freigesetzte Stoffe (Gewebsthromboplastine). Sie beinhaltet die aufeinanderfolgende und zum Teil sich selbst verstärkende Aktivierung von Plasmafaktoren, die schließlich mit der Bildung eines Fibringerinnsels endet. Ein zentrales Intermediärprodukt, das Thrombin, übt wiederum Einfluß auf die Aktivierung der Thrombozyten aus. Es gibt viele Hemmstoffe der plasmatischen Gerinnung. Deren wichtigster, Antithrombin III, wirkt vor allem hemmend auf den Faktor Xa und auf das Thrombin. Seine Wirkung wird durch Heparin potenziert.

Abb. 1: Das System der plasmatischen Gerinnung (modifiziert nach: Großer Gerinnungsstatus, Fa. Behring)

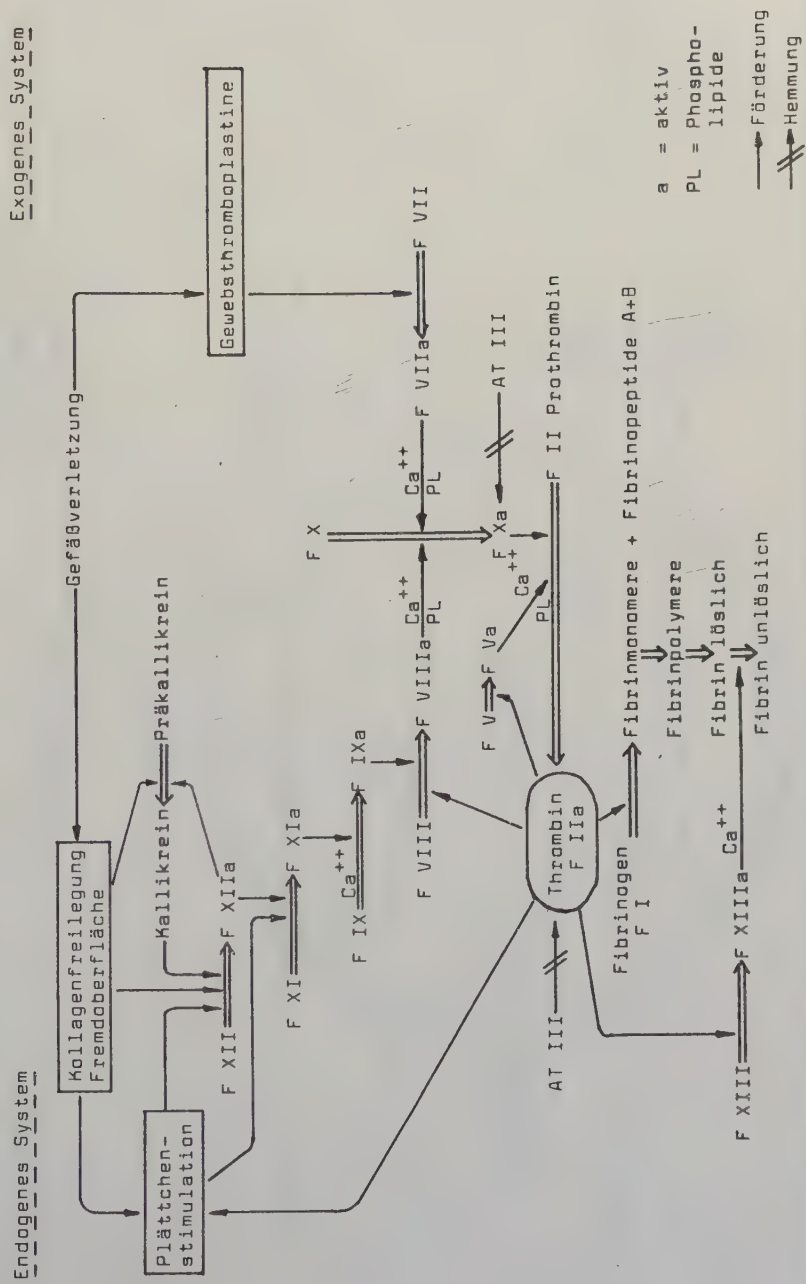
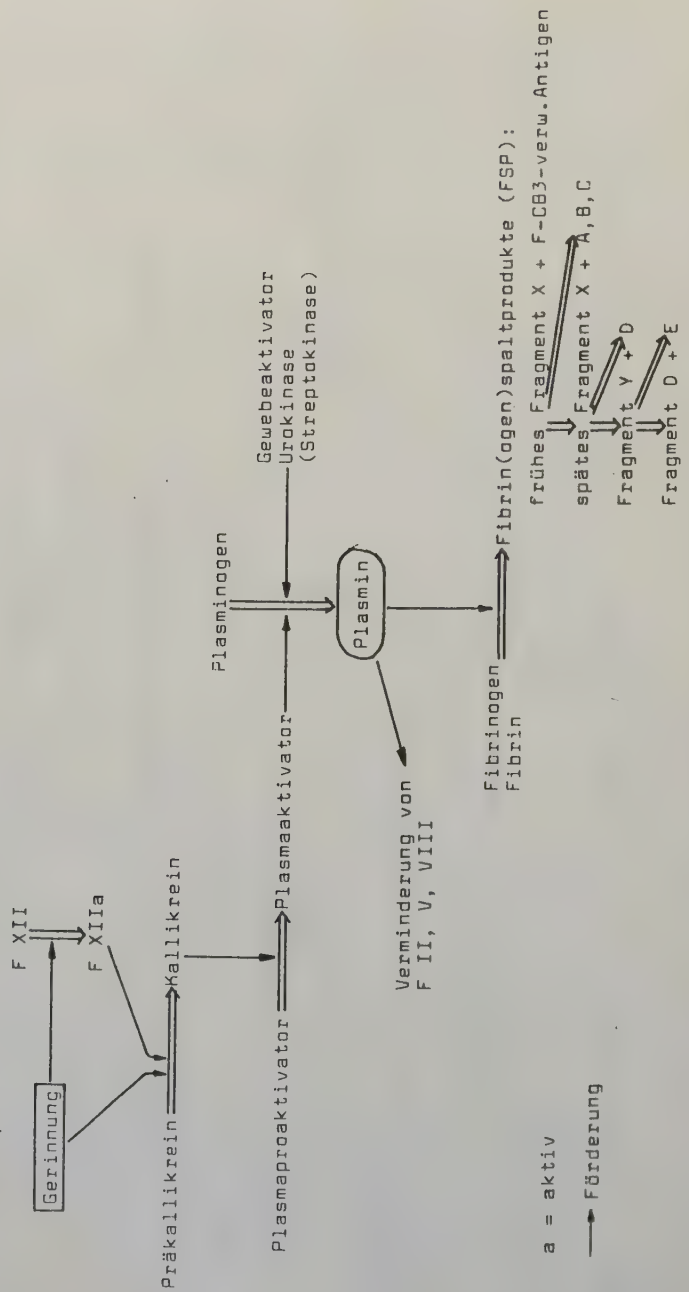


Abb. 2: Das System der Fibrinolyse (modifiziert nach: Großer Gerinnungsstatus, Fa. Behring)

Exogenes System

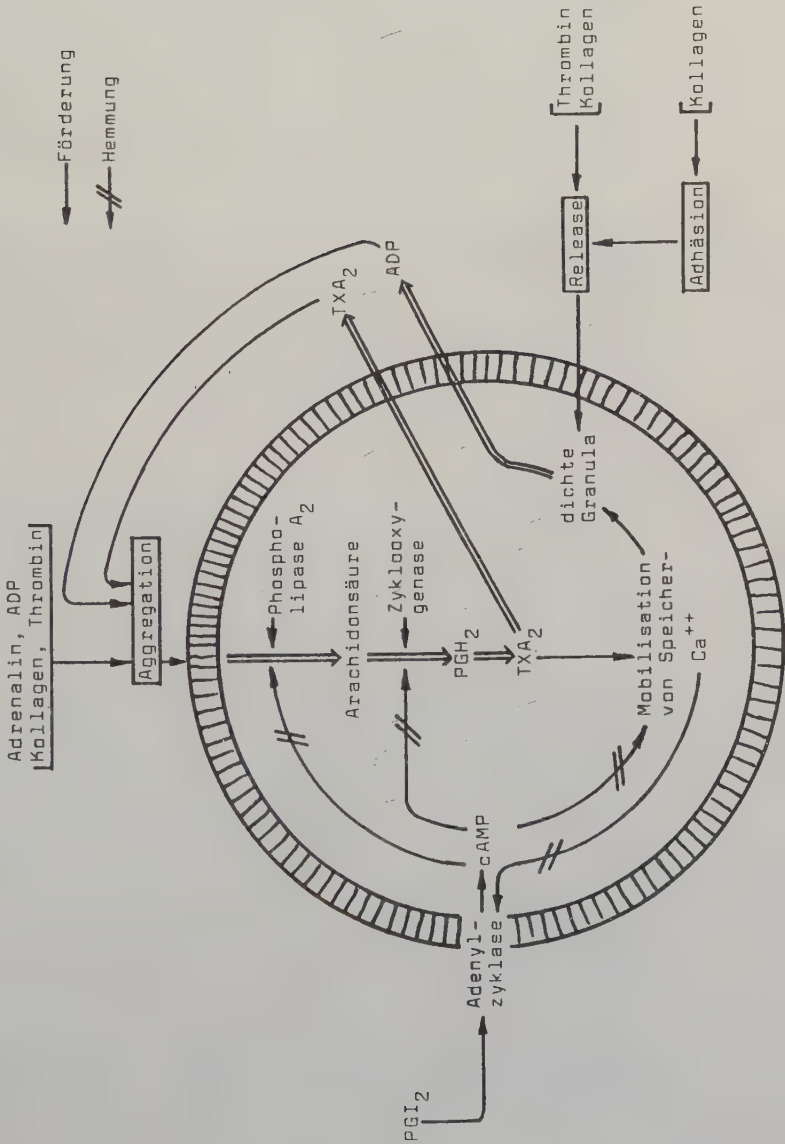
Endogenes System



a = aktiv

→ Förderung

Abb. 3: Schema der Thrombozytenaktivierung; modifiziert nach (51)



Eng verknüpft mit der plasmatischen Gerinnung ist deren Antagonist, die Fibrinolyse. Auch sie läuft über einen endogenen und einen exogenen Weg ab. Am Anfang des endogenen Weges steht wie bei der plasmatischen Gerinnung F XII und das Enzym Kallikrein, der exogene Weg wird über Gewebsaktivatoren gestartet (enthalten z.B. in Uterus, Prostata, Lunge, Nebennieren, Blutgefäßwänden). Am Ende steht das Enzym Plasmin, das Fibrinogen und Fibrin zu spalten vermag.

Insgesamt gesehen beruht die Hämostase auf einem ausgewogenen Verhältnis prokoagulatorischer und antikoagulatorischer Vorgänge. Dieses empfindliche Gleichgewicht kann gestört werden nach der einen Seite mit der Gefahr des Auftretens von Thromboembolien und nach der anderen Seite der Entstehung von Hämorrhagien.

1.4 Grenzen und Möglichkeiten hämostaseologischer Untersuchungen bei Blutzellseparation

Bei der Durchführung eines extracorporalen Kreislaufs wie z.B. bei einer BZS ist folgendes zu bedenken:

Außer einer punktuellen Gefäßwandverletzung an den Einstichstellen tritt keine mechanische Beeinträchtigung der Gefäße auf. Es kommt folglich auch zu keiner intravasalen Freilegung kontaktaktivierender Strukturen (Intrinsic-System) oder Freisetzung gerinnungsaktiver Substanzen (Extrinsic-System). Das Blut fließt in einem Schlauch mit körperfremder Oberfläche, welche eine Kontaktaktivierung der Thrombozyten, der plasmatischen Gerinnung und der Fibrinolyse (Intrinsic-System, F XII, F XI) bewirken kann. Im Gegensatz zum Gefäßendothel sind in der körperfremden Oberfläche keine protektiven Eigenschaften (Prostazyclin) vorhanden. Fremdoberflächen neigen zudem zur Adsorption von gelösten Stoffen, darun-

ter auch Gerinnungs- und Fibrinolysefaktoren. Das Blut wird alteriert durch Rollerpumpen und die bei der Zentrifugation auftretenden Scherkräfte. Eine Zerstörung mit Freisetzung von Inhaltsstoffen, Funktionsbeeinträchtigung oder Aktivierung von Thrombozyten wäre denkbar. Dem Blut zugesetzte Stoffe (wie Heparin, Citrat, Erythrozytensedimentationsmittel, Stimulantien) können zusätzlich Einfluß auf die Thrombozytenfunktion, Thrombozytenzahl, die plasmatische Gerinnung und die Fibrinolyse haben.

Nach Heene und Lasch (31) äußert sich eine diffuse Aktivierung des Gerinnungspotentials in einer ersten Phase in einer nur kaum faßbaren Veränderung der Gerinnungsparameter. Die Einzelfaktoren V, VIII und II sind zuerst in ihrer Aktivität gesteigert, was zu einer leichten Verkürzung der PTT führen kann. Die Thrombozyten und das Fibrinogen befinden sich an der unteren Grenze der Norm. In einer zweiten Phase kommt es zu einem beginnenden Verbrauch der Gerinnungsfaktoren V, VIII, XIII und des Fibrinogens mit entsprechenden, aber nur leichten Verlängerungen der PTT und der PT. Die Thrombozyten sind nun eindeutig vermindert. Die dritte Phase zeigt eine Steigerung dieser Veränderungen.

Lösliches Fibrin stellt ein Intermediärprodukt der Umwandlung von Fibrinogen in ein Fibringerinnsel dar und ist damit Indikator einer Thrombinwirkung. Die vermehrte Konzentration von löslichem Fibrin im Plasma ist ein Beweis für eine Aktivierung der intravasalen Gerinnung (45,64).

Antithrombin III als der wohl wichtigste Inhibitor der plasmatischen Gerinnung wird bei diffuser Gerinnungsaktivierung verbraucht. Ein Absinken der Plasmakonzentration stellt somit auch ein Indiz für einen Gerinnungsvorgang dar.

Young et al. (91) zeigten, daß Veränderungen der Plättchenzahl, des Fibrinogens, des AT III und das Auftreten

von Fibrinmonomeren während eines kardiopulmonalen Kreislaufs brauchbare Indikatoren einer plasmatischen Gerinnungsaktivierung sind. Gerinnungszeiten wie ACT, PTT, PT und Einzelfaktorenbestimmungen (F V, F VIII) erwiesen sich als ungeeignet. Zwar werden in einem Gerinnungsablauf Einzelfaktoren verbraucht und müßten somit als Indikatoren brauchbar sein, doch zeigte sich, daß sie im extracorporalen Kreislauf auch durch Adhäsion an Oberflächen und Verdünnungsprozesse vermindert werden, so daß eine Differenzierung zwischen Adhäsion und Verdünnung sowie gleichzeitigem Verbrauch in einem Gerinnungsvorgang schwer möglich ist. Ähnliches Verhalten zeigten die Gerinnungszeiten ACT, PTT und PT. Lediglich AT III, Fibrinogen und die Plättchenzahl zeigten Abfälle, die im Falle einer Gerinnungsaktivierung, sichtbar am Auftreten von Fibrinmonomeren, signifikant stärker ausgeprägt waren als bei fehlender Gerinnungsaktivierung (91).

Grundsätzlich ist bei den Gerinnungszeiten zu bedenken, daß sie durch die Verwendung von Heparin als Antikoagulan auf jeden Fall in eindeutiger Weise verlängert sind und somit keine Aussage über einen möglichen Verbrauch abhängiger Gerinnungsfaktoren gestatten. Weiter ist zu bedenken, daß Einzelfaktoren wie F VIII so große Streubreiten im Normalbereich aufweisen, daß Veränderungen ohne wesentliche Aussagekraft sind.

Mit der Aktivierung der plasmatischen Gerinnung wird fast gleichzeitig und reaktiv deren Antagonist, die Fibrinolyse ausgelöst. In unserem Falle steht die Aktivierung des Intrinsic systems über die gemeinsamen Starter beider Systeme, Gerinnung und Fibrinolyse, Kallikrein und F XII im Vordergrund. Nach Barthels und Poliwoda (6) zeigt sich eine gesteigerte fibrinolytische Aktivität in einem Verbrauch des Plasminogens (vergleichbar dem Fibrinogen) und als Ausdruck der Plasminwirkung in einem Anstieg der Fibrin(ogen)spaltprodukte

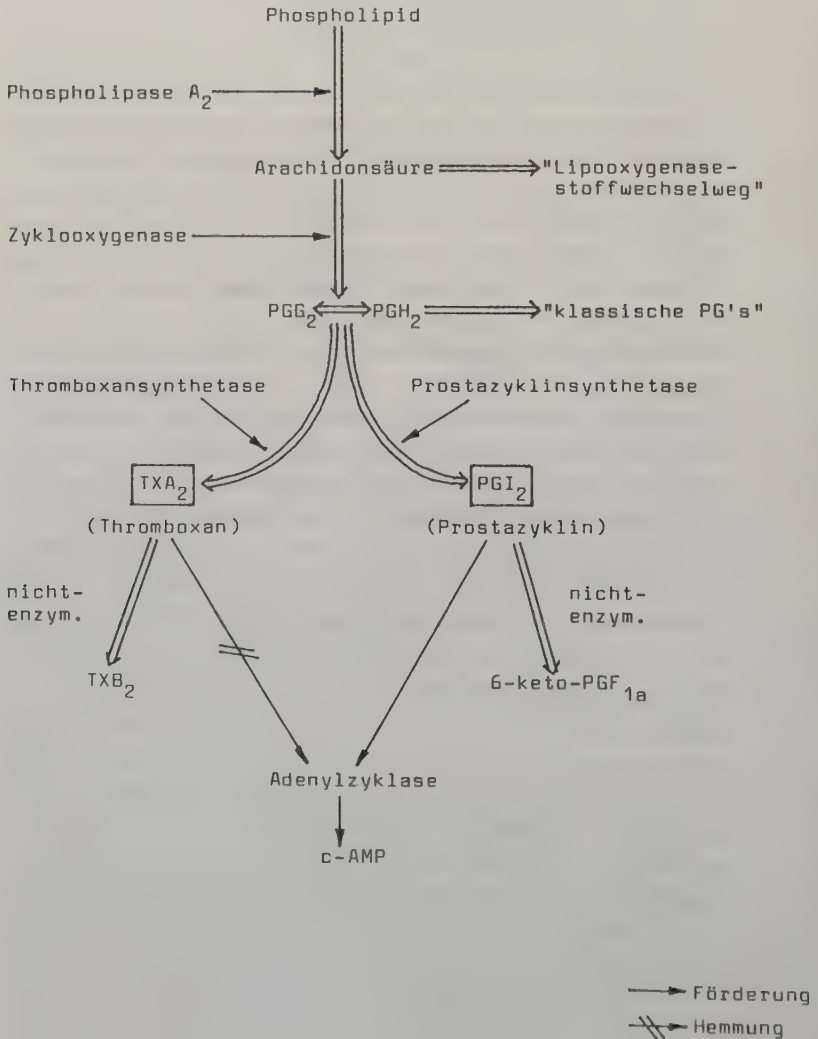
(vergleichbar mit den Fibrinmonomeren). Ein frühes plasmininduziertes Fibrinolyseprodukt aus der C-terminalen Hälfte der α -Kette, das F-CB 3 verwandte Antigen, zeigt schon Anstiege, bevor es zu meßbaren Veränderungen der FSP kommt (20). Wir wählten deshalb die Bestimmung von Plasminogen, FSP und F-CB 3 als Indikatoren für eine erhöhte fibrinolytische Aktivität.

Die gesteigerte Thrombozytenfunktion kann durch mehrere Methoden erfaßt werden, die jeweils eine ihrer Qualitäten beurteilen. Dazu zählt die Bewertung der Adhäsion (Retention), der Spontan- und induzierten Aggregation und der Freisetzungsreaktion. Bei der Stimulation von Plättchen z.B. durch Thrombin, Kollagen, Adrenalin oder ADP kommt es zur Aggregation und gleichzeitig in den Thrombozyten zur Bildung von Thromboxan A_2 , einem Produkt des Arachidonsäuremetabolismus (Abb. 3, 4). Thromboxan führt im Thrombozyten über die Releasereaktion zur Freisetzung von ADP aus den dichten Granula, welches seinerseits zur Aggregation anderer Plättchen führt (Abb. 3). Zusätzlich bewirkt Thromboxan im Thrombozyten über eine Calciummobilisation eine Hemmung der Adenylatzyklase und damit eine Senkung des c-AMP-Spiegels (Abb.3). C-AMP wirkt regulierend auf die Plättchenaggregation.

Thromboxan A_2 wird aber auch vom Thrombozyten nach außen freigesetzt und führt somit zur Aktivierung und Aggregation weiterer Plättchen (52,85).

Bisher wurden als Hinweis für eine Plättchenaktivierung die Konzentrationserhöhung der Plättcheninhaltsstoffe PF 4 und β -TGB im Plasma und eine Steigerung der Spontan- und induzierten Aggregation herangezogen. Mit der Bestimmung des Plasmathromboxanspiegels ist eine zusätzliche Beurteilung des Aktivierungsgrades der Thrombozyten möglich.

Abb. 4: Schema des Arachidonsäuremetabolismus



2. ZIELSETZUNG

Aufgrund von eigenen Beobachtungen, daß sich im Thrombozyten-Leukozyten-Absaugschlauch des Blutzellseparators IBM 2997 deutliche Thrombozytenaggregate zeigen, stellte sich uns die Frage, ob während der Blutzellseparation im Routinebetrieb eine Aktivierung des Gerinnungspotentials, im speziellen der Thrombozyten stattfindet und damit zu einer Gefährdung der Spender führt.

Eine Möglichkeit zur Beantwortung dieser Frage ist es, mittels geeigneter Parameter die plasmatische Gerinnung, die Fibrinolyse und die Thrombozyten im zeitlichen Vergleich vor und nach Zellseparation und im örtlichen Vergleich vor und hinter dem Zellseparator zu untersuchen. Aus den Überlegungen des vorhergehenden Abschnittes schienen uns folgende Parameter hierfür geeignet: Als Indikator für Veränderungen des plasmatischen Systems untersuchten wir AT III, Fibrinogen und die löslichen Fibrinmonomerkomplexe, da es bei einer Aktivierung der plasmatischen Gerinnung in eindeutiger Weise zu einem Abfall des AT III und des Fibrinogens und zu einem Anstieg der LFMK kommt (45,64,91). Zur Bewertung der Fibrinolyse wählten wir das Plasminogen, die Fibrin(ogen)spaltprodukte und das F-CB 3 verwandte Antigen, da sich eine Aktivierung der Fibrinolyse in einem Abfall des Plasminogens und in einem Anstieg der FSP und des F-CB 3 verwandten Antigens äußert (6,20). Zur Beurteilung der Thrombozytenfunktion untersuchten wir den stabilen Metabolit des Thromboxan A_2 , das Plasmathromboxan B_2 , da es direkt den Aktivierungsgrad der Thrombozyten widerspiegelt (85). Während der Zythopherese kommt es durch Hinzufügung von Antikoagulantienlösungen, Erythrozytensedimentationsmitteln etc., bzw. Entfernung von Untersuchungsproben oder Separationsprodukten zu unspezifischen Konzentrationsänderungen im Sinne einer Verdünnung oder Eindickung. Wir versuchten zum einen rechnerisch, zum anderen experimentell eine Abschät-

zung dieser Effekte. Zur experimentellen Schätzung schien uns am geeignetsten die Bestimmung der Gesamteiweißkonzentration zu sein (78).

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Material

3.1.1. Spender

In die Untersuchung einbezogen wurden 27 gesunde Blutspender aus dem Routinebetrieb des BRK-Blutspendedienstes in München, darunter 26 Männer und 1 Frau im Alter zwischen 30 und 59 Jahren (Tabelle 2). Mit Ausnahme eines Spenders hatten alle eine Sperrfrist von 6 Wochen zwischen den Spenden einzuhalten. Ein Spender war als Verwandter des Empfängers von dieser Regel ausgenommen, von ihm wurden zwei Separationen in einem Abstand von fünf Tagen in die Untersuchung aufgenommen. Die Spender wurden vorher allgemein klinisch und laborchemisch auf das Vorliegen einer Hepatitis B oder Lues untersucht. Sie sind zwar angehalten, regelmäßige Medikamenteneinnahme anzugeben, jedoch sind sporadische Medikamenteneinnahmen nicht ausgeschlossen.

3.1.2. Ort der Untersuchungen

Die Zellseparationen wurden unter Routinebedingungen im Blutspendedienst des BRK in München durchgeführt und zwar ausschließlich mit Blutzellseparatoren des Typs IBM 2997. Die Blutentnahme und Aufbereitung der Proben erfolgte im BRK. Die hämostaseologischen und laborchemischen Bestimmungen wurden zum größten Teil im hämostaseologischen Labor der III. Medizinischen Klinik des Klinikums München-Großhadern durchgeführt, die Bestimmungen von Erythrozyten-, Leukozyten- und Thrombozytenkonzentrationen im Labor des BRK-Blutspendedienstes, die F-CB 3-Bestimmung im hämostaseologischen Labor der Medizinischen Klinik Innenstadt der Universität München,

Tabelle 2: Spenderstatus

Pherese Nr.	Datum	Initi- alen	Geschlecht	Alter (Jahre)	Körper- größe (cm)	Körper- gewicht (kg)
A 1	14.01.81	G.W.	m	50	171	67
A 2	09.01.81	K.L.	m	32	174	70
A 3	14.01.81	H.K.	m	48	185	79
A 4	09.01.81	G.N.	m	53	182	90
A 5	15.01.81	M.R.	m	30	173	80
A 6	09.01.81	L.R.	m	38	172	79
A 7	15.01.81	K.K.	m	59	182	65
A 8	13.01.81	R.U.	w	37	169	62
A 9	16.01.81	W.A.	m	46	180	82
A 10	16.01.81	S.E.	m	31	183	88
A 11	16.01.81	J.K.	m	45	182	74
A 12	20.01.81	F.J.	m	54	176	59
A 13	21.01.81	H.K.	m	41	182	99
A 14	21.01.81	S.E.	m	31	183	88
A 15	21.01.81	P.K.	m	46	182	75
A 16	21.01.81	H.K.	m	47	173	67
A 17	06.02.81	H.H.	m	36	179	82
A 18	06.02.81	E.R.	m	57	187	90
A 19	10.02.81	S.S.	m	41	182	81
B 1	04.08.81	L.R.	m	38	172	79
B 2	04.08.81	H.L.	m	40	174	72
B 3	05.08.81	R.K.	m	55	172	72
B 4	05.08.81	W.B.	m	33	184	85
B 5	05.08.81	S.W.	m	43	180	72
B 6	06.08.81	S.M.	m	38	176	75
B 7	06.08.81	S.R.	m	34	185	82
B 8	06.08.81	S.H.	m	36	181	90
B 9	07.08.81	W.M.	m	38	185	86

die Gesamteiweißbestimmung im Hauptlabor des klinisch-chemischen Institutes des Klinikums München-Großhadern.

3.1.3. Blutzellseparation mit dem IBM 2997 blood processor im BRK-Blutspendedienst München

Der BZS IBM 2997 bietet Möglichkeiten zur Leukopherese mit und ohne Erythrozytensedimentationsmittel (ESM), zur Thrombozytopherese und zur Plasmapherese (35). Im Routinebetrieb des BRK-Blutspendedienstes München wurde zum Zeitpunkt der Untersuchung häufig die Leukozytopherese mit ESM durchgeführt, die eine besonders hohe Granulozytenausbeute erbringt. So waren 28 der durchgeführten Separationen Leukozytopheresen und nur 1 eine Thrombozytopherese.

Wie schon in 1.1. gesagt, arbeitet der BZS IBM 2997 mit kontinuierlichem Blutfluß. Der Spender ist durch zwei Venenpunktionen an den Kreislauf Spender-BZS-Spender angeschlossen. Gleich nach der Punktionsstelle wird dem zufließenden Blut Antikoagulans und eventuell ESM zugegeben. Das Blut fließt dann kontinuierlich durch den BZS, wo ihm der gewünschte Bestandteil entzogen wird und anschließend über die zweite Venenpunktionsstelle zurück zum Spender (Abb. 5).

Die IBM nützt das Prinzip der Auftrennung der Blutbestandteile durch Zentrifugation. Dabei sedimentieren die einzelnen Bestandteile entsprechend ihrem spezifischen Gewicht und ihrer Größe (Abb. 6). Die Separation der Blutkomponenten wird in Separationsringen durchgeführt, die ebenso wie das zu- und abführende Schlauchsystem nur einmal verwendet werden. Der Standardseparationsring besteht aus einem gepreßten, halbstarren Plastikschlauch mit rechteckigem Querschnitt. Der Ring ist

Abb. 5: Vereinfachte Schemadarstellung
der Blutzellseparation mit
Blutprobenentnahmestellen

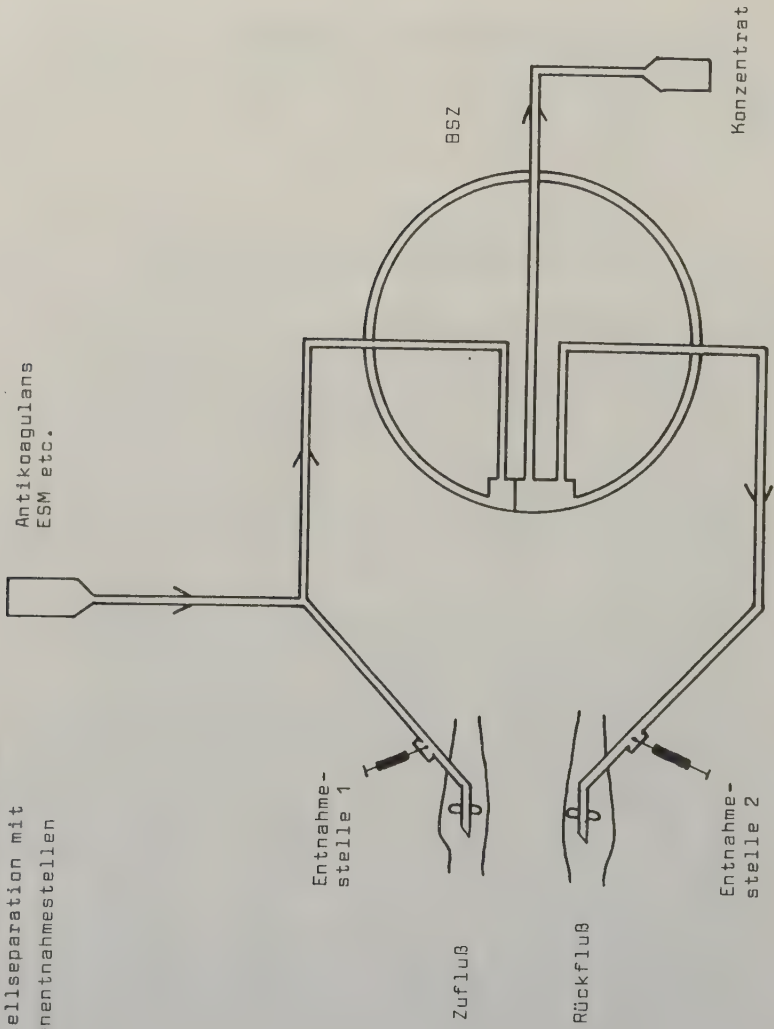
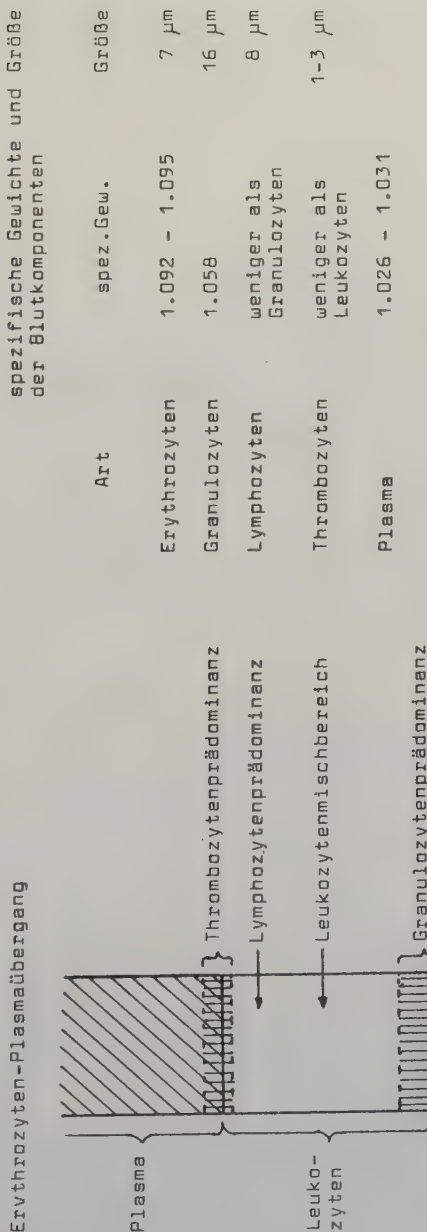


Abb. 6: Gewichts- und Größenspezifische Separation der Blutkomponenten
(modifiziert aus: Bedienungsanleitung BZS IBM 2997)

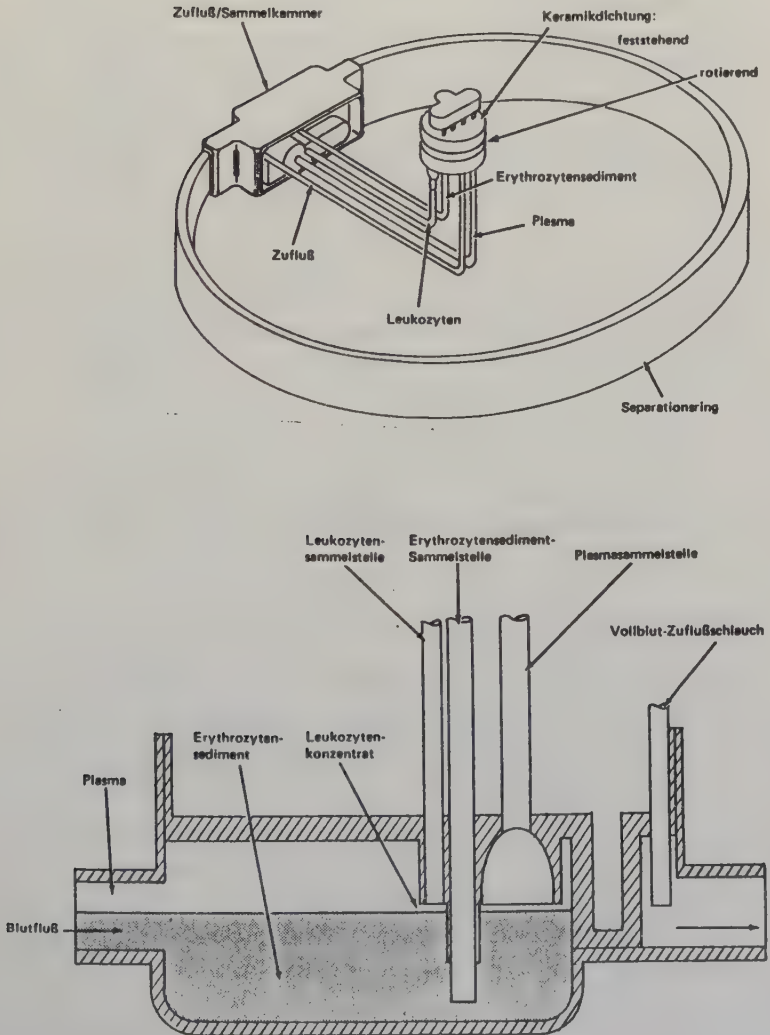


an beiden Enden an eine Zufluß- und Abflußkammer angeschlossen und stellt eine geschlossene Schleife dar (Abb. 7). Durch vier Schläuche, die den keramischen Dichtungsring mit der Zufluß- und Sammelkammer verbinden, können einerseits Vollblut, andererseits Buffy-coat, Erythrozyten und Plasma fließen. Das Erythrozytenkonzentrat sammelt sich im äußersten radialen Bereich der Kammer. Hier befindet sich auch die Absaugöffnung für die Erythrozyten. Die Buffy-coat-Absaugung und die Plasmaabsaugung sind so platziert, daß sie in den Bereichen der Kammer liegen, in denen sich die entsprechenden Komponenten ansammeln. Durch Steuerung der Erythrozyten- und Plasmaflußraten (ml/min) mittels Rollerpumpen kann der Erythrozyten-Plasma-Übergang so platziert werden, daß die gewünschte Zellart durch den Leukozytenschlauch abgesaugt werden kann. Plasma und Erythrozyten werden hinter der Maschine wieder vereinigt und dem Spender zurückgeführt. Es sind mehrere Sicherheits- und Überwachungseinrichtungen vorhanden, für unsere Betrachtung besonders wichtig zwei Sicherheitskammern im Zu- und Rückfluß mit Filtern.

Bei unserer Untersuchung wurde die Sammlung von Buffy-coat folgendermaßen durchgeführt:

Der Spender erhält zu Anfang 2500 I.E. Heparin intravenös. Der Separationsring und das Schlauchsystem werden mit physiologischer Kochsalzlösung vorgefüllt, um die Luft aus dem System zu entfernen. Dazu werden von einem 500 ml-Beutel, angereichert mit 1000 I.E. Heparin, maximal 200 ml verwandt. Die insgesamt zugeführte Heparinmenge beträgt demnach maximal 3000 I.E.. Der Spender wird mittels zweier Venenpunktionen für Zu- und Rückfluß an das System angeschlossen. Im Falle der Leukozytopenese wird in den Zuflußschlauch eine Mischung aus ESM und Antikoagulans gegeben, in unserem Falle 40 ml Trisnatriumzitrat 33,3 %, pH 7,7 (BRK, eigene Herstellung) gelöst in 500 ml HÄS 6 % (Plasmasteril^R, Fresenius Ham-

Abb. 7: Standardseparationsring des BZS IBM 2997
Zufluß/Sammelkammer im Schnittbild
(aus Bedienungsanleitung BZS IBM 2997)



burg). Umgerechnet entspricht dies einer reinen Zitratkonzentration von 1,6 %. Im Vergleich beträgt die reine Zitratkonzentration der üblichen Zitratlösungen für ACD Formel A 2,1 % und ACD Formel B ca. 1,3 % (Berechnung nach 36). Das Zufuhrverhältnis der Zitratlösung beträgt anfänglich 1:8, später 1:12 - 1:14. Im Falle der Thrombopherese wird eine 1,5 % Zitratlösung in einer Glucoselösung verwandt (Biostabil^R, Biotest Pharma Dreieich) in einem Zufuhrverhältnis von anfänglich 1:10 und später 1:16. Die Gesamtzufuhr beträgt für die HÄS-Lösung ca. 500 ml und für Biostabil ca. 100 ml. Die Zentrifugendrehzahl beträgt bei Leukozytopherese ca. 750 U/min entsprechend ca. 90 G, bei Thrombopherese ca. 1400 U/min entsprechend ca. 350 G. Die Blutflußgeschwindigkeit beträgt ca. 50 - 60 ml/min, die Durchflußdauer ca. 4 min, die Konzentratflußrate ca. 4,5 ml/min. Das extrakorporale Volumen liegt bei 260 ml. Separationsring, zu- und abführendes Schlauchsystem bestehen aus Polyvinylchlorid. Eine Leukozytopherese dauert ca. 1,5 Stunden, eine Thrombopherese ca. 1 Stunde.

3.1.4. Gewinnung und Präparation des Untersuchungsmaterials

Folgende Blutproben wurden entnommen (siehe auch Abb. 5):

A Zum zeitlichen Vergleich vor und nach Separation

Vor-Wert: Sofort nach Anschluß des Spenders auf der Zuflußseite vor der Antikoagulanzzugabestelle.

(n = 19, Probe A 1-19 v, Entnahmestelle 1)

Nach-Wert: Am Ende der Separation an der gleichen Stelle wie der Vor-Wert.

(n = 19, Probe A 1-19 n, Entnahmestelle 1)

B Zum örtlichen Vergleich vor und hinter dem Separator

Vor-Wert: Gegen Ende der Separation auf der Zufluß-
seite vor der Antikoagulanzzugabestelle.

(n = 9, Probe B 1-9 zu, Entnahmestelle 1)

Nach-Wert: Gleichzeitig wie der Vor-Wert auf der
Rückflußseite.

(n = 9, Probe B 1-9 rü, Entnahmestelle 2)

Nach diesem Modus wurden Proben entnommen bei 28 Leuko-
zytopheresen (A 1-9, A 11-19, B 1-9) und bei einer Throm-
bozytopherese (A 10).

Die Entnahme erfolgte mit Polypropyleneinmalspritzen
(Freka^R Fresenius Hamburg), in denen Antikoagulans vor-
gelegt war:

- 10 ml 1/10 mit einem Zitrat/Trasylo1-Gemisch zur
Plasmagewinnung für die Bestimmung von Antithrom-
bin III, Fibrinogen, Plasminogen, löslichen Fibrin-
monomerkomplexen, Fibrinospaltprodukten und Gesamt-
eiweiß.
- 4 ml 1/50 mit einem EDTA/Indomethacin-Gemisch für
die Bestimmung von Plasmathromboxan B₂.
- Vacutainer^R-Röhrchen (Wellcome) mit einem Thrombin/
Trasylo1/Kaolin-Gemisch für die Serumgewinnung zu
F-CB 3-Bestimmung.
- EDTA-Röhrchen (Greiner) zur Zellzählung.

Die Blutproben zur Plasma- bzw. Serumgewinnung wurden in
einer Zentrifuge (Hettich Rotina S) für 10 min. bei
3500 U/min zentrifugiert. Danach wurde der Plasma- bzw.
Serumüberstand abpipettiert, in Microreaktionsgefäße
(Fa. Eppendorf) aufgeteilt und bei -30⁰ Celsius einge-
froren.

3.2. Methoden

3.2.1. Zellzählung

Die Bestimmung der Erythrozyten- Leukozyten- und Thrombozytenkonzentration im Spenderblut und in den gewonnenen Konzentraten erfolgte mit einem Coulter Counter Modell DN bzw. Thrombocounter (Coulter Electronics). Zusätzlich wurde das Gewicht des gewonnenen Konzentrates bestimmt. Eine Umformung in Volumeneinheiten erfolgte unter der Berücksichtigung eines geschätzten spezifischen Gewichtes des Konzentrates von 1,05 g/ml. Damit war die Bestimmung der gewonnenen Gesamtzellmenge möglich.

3.2.2. Gesamteiweiß

Die Bestimmung erfolgte mit der üblichen Biuret-Methode.

3.2.3. Antithrombin III

a) immunologisch:

Die immunologische Bestimmung des AT III erfolgte mittels der Elektroimmunodiffusion nach Laurell (49).

Prinzip:

Antigene (hier AT III) werden auf ein Agarose Gel von gleichmäßiger Dicke aufgebracht, das den korrespondierenden Antikörper enthält. Ein elektronisches Feld induziert die Wanderung der Antigene und Antikörper. Beide reagieren miteinander und bilden dabei Präzipitationszonen in Form von Raketen ("rockets",

Abb. 8). Ungebundene Antigene innerhalb des konischen Kopfbereiches wandern in die Zone des Niederschlags und lösen die Antigen-Antikörper-Komplexe wieder auf. Die Präzipitationszone wird in Richtung einer der Elektroden in dem Maße versetzt, wie die freien Antigene verschwinden. Die letztendliche Position der Präzipitationsfront variiert mit dem Betrag des zugeführten Antigens.

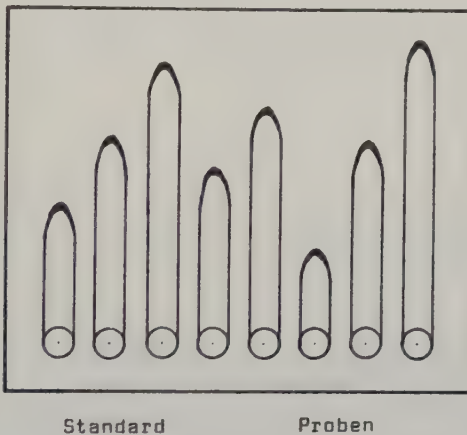


Abb. 8: Elektroimmunodiffusion nach Laurell, typische "Raketen"

Methodenbeschreibung:

Zuerst wird aus Agarose und Barbitalpuffer unter Erhitzen auf 90°C ein flüssiges Gel hergestellt. Während des Abkühlens wird genau bei 56°C der Antikörper (Clotimmun-AT III^R, Behring) zugegeben und das noch flüssige Gel auf eine Glasplatte gegossen. Bei weiterer Abkühlung verfestigt sich das Gel. Am unteren Rand werden Löcher zur Einbringung der Proben

ausgestanzt. Aus einem Standardplasma (Protein-Standard-Plasma, Fa. Behring) wird mit Barbitallpuffer eine Verdünnungsreihe hergestellt. Je 5 μ l der Standardproben und Testproben werden mit einem Partigendispenser^R in die vorgestanzten Löcher gegeben. Die Glasplatten werden nun in eine Elektrophoresekammer gelegt und für 1,5 Stunden eine Gleichspannung von 32 - 40 Volt zwischen Ober- und Unterrand angelegt. Danach färbt man die Platten mit einer Coomassie-brillant-blau-Lösung und entfärbt sie unter Sicht. Aus der abgelesenen Höhe der Standardproben wird eine Bezugskurve erstellt und daraus die Werte der Testproben ermittelt.

b) funktionell:

Die funktionelle Bestimmung des AT III erfolgte mit einer enzymatischen Methode unter Verwendung eines chromogenen Substrates (1).

Prinzip:

Antithrombin III wird als Heparincofaktor bestimmt. Dem Testplasma wird im Überschuß Heparin zugesetzt, damit alle AT III - Moleküle mit Heparin einen Komplex bilden. Nun wird eine genau definierte Menge Thrombin im Überschuß zugegeben. Nur ein Teil der Thrombinmenge wird durch den AT III - Heparinkomplex gehemmt. Das nicht gehemmte Thrombin wirkt auf das chromogene Substrat und spaltet dabei den Farbstoff Nitroanilin ab (Abb. 9).

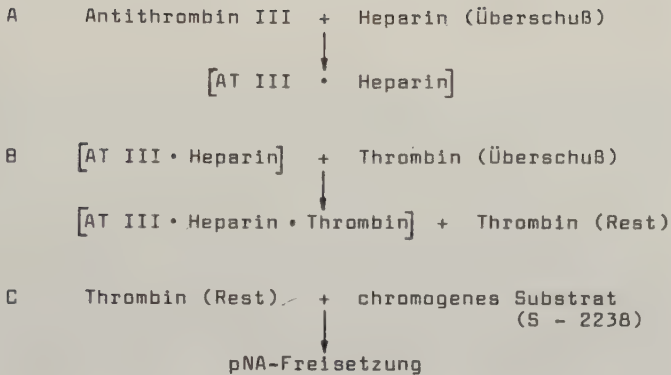


Abb. 9: Reaktionsschema zur AT III - Bestimmung mit chromogenem Substrat

Methodenbeschreibung:

Wir verwendeten den käuflichen Kit Coatest Antithrombin (Kabi-Diagnostika).

Zur Probenverdünnung und zur Erstellung der Verdünnungsreihe der Standardprobe wird Tris-Puffer verwendet, dem das im Überschuß notwendige Heparin zugefügt ist. Nach Inkubation mit 37° C wird in genau definierten Zeitabständen zuerst Thrombin, dann das chromogene Substrat (S-2238 H-d-Phe-Pip-Arg-pNA) zugesetzt und die Reaktion durch Zugabe von Essigsäure gestoppt. Aus den gemessenen Extinktionen der Standardproben wird eine Standardkurve erstellt und daraus die Werte der Testproben in Prozent des Normalwertes ermittelt.

3.2.4. Fibrinogen

Die Bestimmung des Fibrinogens erfolgte immunologisch mittels der radialen Immunodiffusion nach Mancini (51).

Prinzip:

Eine gleichmäßig dünne Schicht Agargel enthält den korrespondierenden Antikörper zu dem gesuchten Antigen (hier Fibrinogen). In ausgestanzte Löcher eingebrachtes Antigen diffundiert radial in das Agarosegel und bildet einen Präzipitatring. Der letztendlich erreichte Durchmesser des Ringes ist proportional zur aufgebrauchten Antigenmenge.

Methodenbeschreibung:

Wir verwendeten die käuflichen Immundiffusionsplatten M-Partigen^R (Fa. Behring).

Zur Probenverdünnung und zur Erstellung der Verdünnungsreihe der Standardproben (Protein-Standard-Plasma, Fa. Behring) wird isotonische Kochsalzlösung verwandt. Jeweils 5 μ l der Proben werden mit einem Partigendispenser^R in die vorbereiteten Löcher eingebracht. Nach drei Tagen wird der Durchmesser der entstandenen Präzipitatringe ausgemessen, quadriert und aus den Werten der Standardproben eine Bezugskurve gebildet. Von dieser Bezugskurve können die Werte der Meßproben abgelesen werden.

3.2.5. Lösliche Fibrinmonomerkomplexe

Die Bestimmung der LFMK erfolgte mittels der Agarose-Gel-Filtration nach Hafter und Graeff (25).

Prinzip:

Schickt man Plasma durch eine Agarose-Gel-Säule, er-

scheinen bedingt durch einen molekularen Siebeffekt die LFMK früher als das Fibrinogen am unteren Ende der Säule. Eine vorhergehende Ausfällung von Fibrinogen und der LFMK erlaubt eine densitometrische Bestimmung und eine vorherige Reinigung mit einer Glycinlösung reduziert den Gehalt an störenden Eiweißen wie Albumin und Ig G. Durch planimetrische Auswertung der Elutionskurve kann der Anteil der LFMK am Gesamtfibrinogen bestimmt werden (Abb. 10).

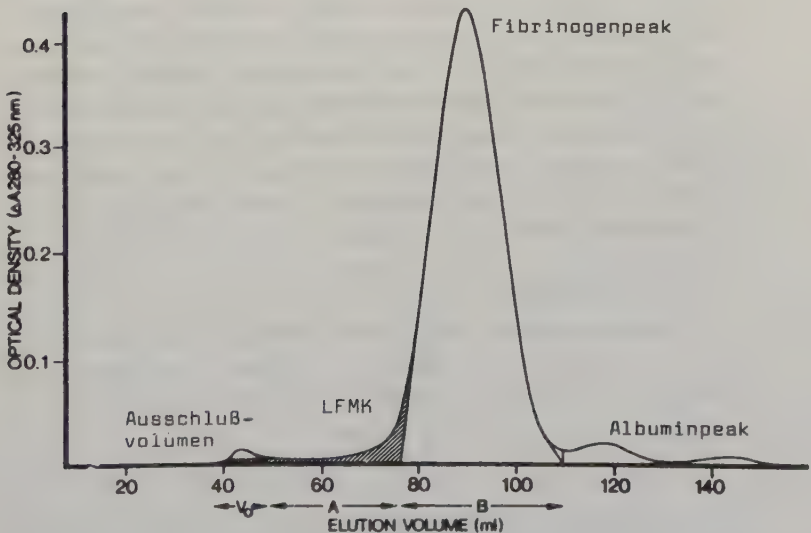


Abb. 10: Elutionskurve bei der Agarosegelfiltration zur Bestimmung der löslichen Fibrinmonomerkomplexe nach Hafer und Graeff

3.2.6. Plasminogen

a) immunologisch:

Die immunologische Bestimmung des Plasminogens erfolgte mittels der radialen Immunodiffusion nach Mancini (51).

Prinzip und Methodenbeschreibung:

siehe Fibrinogen

b) funktionell:

Die funktionelle Bestimmung des Plasminogens erfolgte mit einer enzymatischen Methode unter Verwendung eines fluorogenen Substrates (70).

Prinzip:

Inaktives Plasminogen wird durch Inkubation mit dem exogenen Aktivator Streptokinase zum Plasminogen-Streptokinase-Komplex (PSK) aktiviert. Der PSK spaltet von einem synthetischen Substrat (H-Val-Leu-Lys-5-Amidoisophtalinsäure-Dimethylester) das fluoreszierende Molekül 5-Amidoisophtalinsäure-Dimethylester (AIE) ab. Die Freisetzung des AIE wird mit einem Fluorometer kinetisch gemessen.

Methodenbeschreibung:

Wir verwendeten den käuflichen Plasminogentest mit dem Protopath^R - Fluorometer (Fa. Dade). Die Werte werden ausgedrückt in Kasein-Einheiten CTA U/ml (Committee on Thrombolytic Agents).

3.2.7. Fibrinogen- und Fibrinospaltprodukte

Die Bestimmung der Fibrinogen- und Fibrinospaltprodukte (FSP) erfolgte mittels der Staphylokokken-Klumpungs-

Reaktion nach Lipinski und Hawiger (29).

Prinzip:

Das Staphylokokken-Reagenz enthält das Bakterium *Staphylococcus aureus*, Stamm Newman D₂C, das auf seiner Zelloberfläche den Clumping-Faktor trägt. Dieser Clumping-Faktor reagiert mit Fibrinogen, Fibrinmonomeren und den Spaltprodukten X und Y. Durch vorhergehende vollständige Gerinnung durch Zugabe von Thrombin kommen nur noch die Spaltprodukte zur Reaktion. Die höchste Serumverdünnung, die noch zu einer Agglutination führt, dient als Maß für die FSP-Menge.

Methodenbeschreibung:

Wir verwendeten das käufliche FSP-Testbesteck (Fa. Behring). Zitratplasma wird zur Serumgewinnung Thrombin in einer Kalziumlösung und zur Plasminhemmung Aprotinin beigegeben. Nach Zentrifugation wird das Gerinnsel mit einem Häkchen entfernt. Aus den Serumproben wird mit Trispufer eine Verdünnungsreihe hergestellt. Jeweils ein Tropfen der Testproben und der Staphylokokken-Reagenz werden auf einer Testplatte vermischt und zwei Minuten geschwenkt. Man notiert die höchste Titerstufe, die noch eine positive Verklumpungsreaktion ergibt. Durch Multiplikation der Titerstufe mit einer vorgegebenen Maßzahl (abhängig von der Art der Testprobe) und der Nachweisgrenze 10 µg/ml erhält man die FSP-Konzentration in µg/ml Serum.

3.2.8. F-CB 3 verwandtes Antigen

Die Bestimmung des F-CB 3 verwandten Antigens erfolgte immunologisch mittels eines für klinische Zwecke modifizierten Radioimmuntests nach Gollwitzer, Wood und Schramm (21).

Prinzip:

Der angewandte Radioimmuntest entspricht der Methode eines kompetitiven Proteinbindungsassays (siehe unter Thromboxanbestimmung). In diesem Falle ist das konkurrierende Antigen ^{125}Jod markiert. Die Trennung der gebundenen und ungebundenen Antigenfraktion erfolgt durch Fällung der Antigen-Antikörper-Komplexe durch Polyäthylenglykol.

3.2.9. Thromboxan B_2

Das aktive Thromboxan A_2 zerfällt schnell (in vitro-HWZ: 30 sec) nichtenzymatisch in das stabile Thromboxan B_2 (TXB_2) (61). Die Bestimmung des TXB_2 erfolgte immunologisch mittels eines Radioimmuntests nach Anhut (5).

Prinzip:

Der angewandte Radioimmuntest entspricht der Methode eines kompetitiven Proteinbindungsassays. Eine bekannte und konstante Menge eines radioaktiv markierten Antigens konkurriert mit der unbekannten Menge des nicht markierten Antigens der Testprobe um die Bindungsstellen eines Antikörpers. Bei steigenden Mengen unmarkierten Antigens werden immer mehr markierte Antigenmoleküle aus den Antikörperbindungsstellen verdrängt. Nach Gleichgewichtseinstellung wird die gebundene und freie Fraktion getrennt und die Aktivität gemessen. Die Höhe der gemessenen Radioaktivität der gebundenen Fraktion ist indirekt proportional zu der Antigenkonzentration in der Testprobe. Das konkurrierende Antigen ist mit Tritium (^3H) markiert. Die Trennung der gebundenen und freien Antigenfraktion erfolgt durch Fällung der Antigen-Antikörper-Komplexe durch einen zweiten Antikörper, der gegen den ersten Antikörper gerichtet ist.

Methodenbeschreibung:

Wir verwendeten folgende käufliche Reagenzien und Geräte:

- markiertes Antigen $^3\text{H-TXB}_2$ (New England Nuclear)
- unmarkiertes Antigen TXB_2 zur Erstellung des Bezugsstandards (Sigma)
- normales Kaninchenserum zur Bestimmung der unspezifischen Bindung des Antigens (Miles)
- Antikörper gegen TXB_2 : Kaninchen-Ig G (Geschenk Prof. Levine, Boston)
- unspezifisches Kaninchen-Ig G als Carrier-Gamma-Globulin zur Optimierung der Präzipitationsreaktion (Sigma)
- Antikörper gegen Kaninchen-Ig G als zweiter Antikörper: Ziegen-anti-Kaninchen-Ig G (Miles)
- Rialfluor Szintillatorflüssigkeit (New England Nuclear)
- Gelatine, konzentriertes HCl, NaCl, Äthanol, EDTA, Indomethacin, Trispuffer
- Mikroreaktionsgefäße aus Polypropylen (Sarstedt), große Gefäße aus Polypropylen (Falcon), Pipetten mit Polypropylenpipettenspitzen, Glasgefäße für den Gammazähler
- gekühlte Zentrifuge, Wasserstrahlpumpe, Gammazähler (Packard)

Für den Testansatz müssen folgende Präparationen hergestellt werden:

- Isogel Tris Puffer (IGT):
10 mM Tris·HCl / 0,14 M NaCl / 0,1 % w/v Gelatine (pH 7,4)
- $^3\text{H-TXB}_2$ -Verdünnung:
Mit IGT-Puffer auf 20.000 cpm/0,1 ml

- TXB₂-Standardverdünnung:

Mit IGT-Puffer auf	4000	pg TXB ₂ /ml
	2000	"
	1000	"
	500	"
	250	"
	125	"

- normales-Kaninchenserum-Verdünnung (NRS):

Mit IGT-Puffer auf 1/20.000

- Anti-TXB₂-Ig G-Verdünnung (Immune Rabbit Plasma IRP):

Mit IGT-Puffer auf 1/20.000

- Kaninchen-Ig G-Verdünnung (Rabbit Ig G RIGG):

Mit IGT-Puffer auf 60 µg/ml

- Ziegen-Anti-Kaninchen-Ig G-Verdünnung (GARIGG):

Mit IGT-Puffer auf 1/8

- EDTA/Indomethacin-Lösung für die Blutentnahme:

7,5 % w/v EDTA + $5 \cdot 10^{-4}$ M Indomethacin

Mischung mit Blut im Verhältnis 1:50

Der Testansatz erfolgt nach dem Pipettierschema der Abb. 11. Von jeder Probe wird eine Dreifachbestimmung vorgenommen. Nach der Über-Nacht-Inkubation werden die Proben für 30 min. bei 2⁰ C bei 2000 g zentrifugiert und die Überstände mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe abpipetiert. Danach wird jeder Probe 1 ml der Riafluor-Szintillatorflüssigkeit beigegeben und gut vermischt.

Art	IGT (ml)	Probe (ml)	$^3\text{H-TXB}_2$ (ml)	NRS (ml)	IRP (ml)		RIGG (ml)	GARIgG (ml)	
NRS	0,1	-	0,1	0,1	-		0,1	0,1	
IRP	0,1	-	0,1	-	0,1		0,1	0,1	
Sta. 4000	-	0,1	0,1	-	0,1		0,1	0,1	
2000	-	0,1	0,1	-	0,1		0,1	0,1	
1000	-	0,1	0,1	-	0,1		0,1	0,1	
500	-	0,1	0,1	-	0,1		0,1	0,1	
250	-	0,1	0,1	-	0,1		0,1	0,1	
125	-	0,1	0,1	-	0,1		0,1	0,1	
Test- probe 1-n	-	0,1	0,1	-	0,1		0,1	0,1	
NRS	0,1	-	0,1	0,1	-		0,1	0,1	
IRP	0,1	-	0,1	-	0,1		0,1	0,1	
Total- counts	-	-	0,1	-	-		-	-	

Mischen und bei 37° C 60 min. inkubieren

Mischen und bei 2° C über Nacht inkubieren

Abb. 11: Pipettierschema zum Testansatz des Radioimmuntests zur Bestimmung des Thromboxan B_2 nach Anhut (5).

Die Radioaktivität jeder Probe wird in einem Gammazähler (Packard) für 10 min. gezählt.

Die Berechnung der erhaltenen Daten geschieht folgendermaßen:

- Berechnung des Durchschnittwertes der Dreifachproben

- Subtraktion des Wertes für die spezifische Antigenbindung (NRS)
- Berechnung des Verhältnisses B/B_0 in Prozentangaben
B steht für Testprobenwert
 B_0 steht für den Maximalwert bei fehlendem markiertem Antigen (IRP)
- Log-lin-Auftragung der Werte. Auf der Abszisse wird die unabhängige Variable im logarithmischen, auf der Ordinate die abhängige Variable im linearen Maßstab aufgetragen
- Von-Hand-Zeichnung des Kurvenverlaufs. Es ergibt sich eine sigmoide Standardkurve (Abb. 12)

Von der erhaltenen Standardkurve können die Testprobenwerte direkt in pg/ml abgelesen werden.

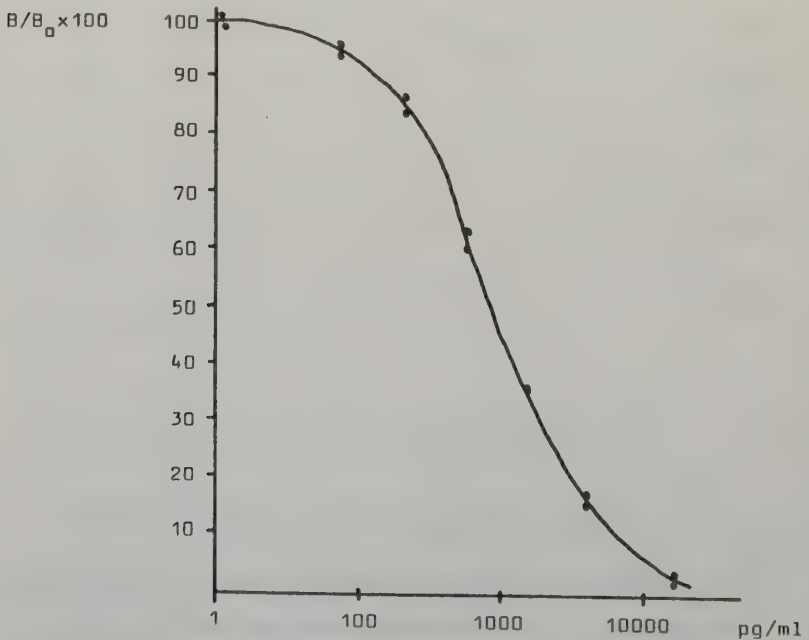


Abb. 12: Log-lin-Auftragung, typischer sigmoider Kurvenverlauf

3.3. Auswertung

Zur Auswertung der Meßergebnisse gingen wir davon aus, daß die Vor- und Nachwerte paarweise entnommene Stichprobenwerte aus zwei Grundgesamtheiten sind, die bezüglich ihrer Lage differieren. Wir errechneten für jedes Wertepaar die Differenz in Prozent zum Ausgangswert, ermittelten unter der Annahme einer Nichtnormalverteilung der Meßgrößen innerhalb der Gruppen als repräsentativen Wert für jede Gruppe den Medianwert und dessen Konfidenzgrenzen auf dem 5 %-Niveau nach Thompson und Nair. Die Annahme möglicher Lagedifferenzen überprüften wir mit dem Rangzeichentest nach Wilcoxon auf dem 5 %-Niveau.

Die statistische Auswertung erfolgte nach Campbell, Statistische Methoden für Biologie und Medizin (Thieme Verlag, Stuttgart).

4. ERGEBNISSE

Sämtliche Einzelergebnisse sind in den Tabellen 5 und 6 auf den Seiten 66 bis 69 zusammengefaßt. Die ermittelten Medianwerte mit ihren Konfidenzgrenzen sind in Tabelle 4 auf Seite 65 aufgeführt.

4.1. Konzentratausbeute und Volumenbilanz

Die bestimmten bzw. errechneten Werte der gewonnenen Konzentrate sind in Tabelle 3 zusammengefaßt.

Der Medianwert (Konfidenzgrenzen) der Leukozytenkonzentration lag bei 320 g (300-350 g), bzw. 305 ml (286-333 ml), der der Leukozytengesamtmenge bei $1,35 \cdot 10^{10}$ Zellen ($1,31 \cdot 10^{10}$ - $1,495 \cdot 10^{10}$) und der der Thrombozytengesamtmenge bei $1,17 \cdot 10^{11}$ Zellen ($0,91 \cdot 10^{11}$ - $1,47 \cdot 10^{11}$). Die entsprechenden Werte des Thrombozytenkonzentrates waren 200 g bzw. 190 ml, $0,23 \cdot 10^{10}$ Leukozyten und $4,81 \cdot 10^{11}$ Thrombozyten.

Die Volumenzufuhr beträgt bei der Leukozytensammlung ca. 200 ml isotoner Kochsalzlösung zur Maschinenvorfüllung und ca. 500 ml HÄS-Lösung im kontinuierlichen Zufluß. Die isotoner Kochsalzlösung geht rasch in das Gesamtextrazellulärwasser über, an dem der Plasmaanteil ca. 25 % beträgt. Die Erhöhung des Plasmavolumens liegt dementsprechend bei ca. 50 ml. HÄS hingegen bleibt zunächst intravasal und verhält sich isoton. Der Volumeneffekt nach 2-6 Stunden, wie in unserem Fall, beträgt ca. 60 % der infundierten Menge, entsprechend ca. 300 ml bei 500 ml Gesamtinfusionsmenge (81). Das ergibt insgesamt am Ende einer 4-5 stündigen Leukopherese eine Zulaufmenge zum Plasmavolumen von ca. 350 ml. Zur Thrombopherese wird eine ähnliche Menge als Vorfülllösung verwandt. Zusätzlich kommen noch ca. 300 ml einer Glucoselösung als ACD-Stabilisator hinzu. Beides zusammen, ca. 500 ml, verteilt sich auf das Extrazellulärwasser und führt

Tabelle 3: Konzentratausbeute

Spender- nummer	Pherese- art	Konzentrat- menge (ml)	Leukocyten- menge ($\times 10^{10}$)	Thrombozyten- menge ($\times 10^{11}$)
A 1	LP	285	1,52	1,48
A 2	LP	238	1,32	0,69
A 3	LP	333	1,31	0,91
A 4	LP	333	1,31	1,39
A 5	LP	285	1,31	0,55
A 6	LP	277	1,27	1,07
A 7	LP	352	1,81	1,32
A 8	LP	362	1,51	1,90
A 9	LP	295	1,84	0,88
A 10	TP	190	0,23	4,81
A 11	LP	381	2,05	1,77
A 12	LP	295	1,33	0,90
A 13	LP	262	0,85	2,63
A 14	LP	310	1,43	1,09
A 15	LP	305	1,25	0,98
A 16	LP	285	1,49	1,47
A 17	LP	305	2,57	1,17
A 18	LP	290	1,22	1,40
A 19	LP	285	0,73	0,84
B 1	LP	238	1,47	1,03
B 2	LP	285	1,44	1,35
B 3	LP	314	1,35	1,17
B 4	LP	390	1,48	1,70
B 5	LP	333	0,96	0,93
B 6	LP	376	1,17	1,64
B 7	LP	333	0,94	1,05
B 8	LP	295	1,75	1,62
B 9	LP	352	1,47	0,85

entsprechend zu einem Anstieg des Plasmavolumens um $500 \text{ ml} \cdot 0,25 = \text{ca. } 125 \text{ ml}$.

Andererseits werden bei einer Leukopherese ca. 305 ml Konzentrat entnommen. Bei einem geschätzten Plasmaanteil von 50-75 % (persönliche Mitteilung BRK München) bedeutet das einen Verlust von ca. 190 ml Plasma. Der entsprechende Wert des Thrombokonzentrates ist 120 ml Plasma. Für alle Untersuchungen entnahmen wir ca. 45 ml Vollblut entsprechend 25 ml Plasma bei einem Hämatokrit von 45 %. Der Gesamtplasmaverlust beträgt demnach für eine Leukopherese ca. 215 ml und für die Thrombopherese 145 ml.

Die Gesamtbilanz ergibt eine Änderung des Plasmavolumens für eine Leukopherese um ca. + 135 ml und für die Thrombopherese um ca. - 20 ml.

Im Plasma gelöste Substanzen gehen isoton mit Plasmaverlusten verloren. Der Rest verteilt sich auf den neu bilanzierten Lösungsraum. Eine dadurch mögliche Konzentrationsänderung errechnet sich folgendermaßen:

$$\text{Konzentration vorher} = K_v$$

$$\text{Konzentration nachher} = K_n$$

$$\text{Zulaufvolumen} = V_{zu}$$

$$\text{Verlustvolumen} = V_{ab}$$

$$\text{Verteilungsvolumen vorher} = V_v$$

$$\text{Verteilungsvolumen nachher} = V_n = V_v + V_{zu} - V_{ab}$$

$$V_v \cdot K_v = V_n \cdot K_n + V_{ab} \cdot K_v$$

$$K_n = \frac{V_v - V_{ab}}{V_n} \cdot K_v = \frac{V_v - V_{ab}}{V_v + V_{zu} - V_{ab}} \cdot K_v$$

Angewandt auf unsere Betrachtung ergibt dies:

1) Vor und nach Leukozytopherese:

$$V_{zu} = 350 \text{ ml} \quad V_{ab} = 215 \text{ ml} \quad V_v = 3450 \text{ ml}$$

Das Verteilungsvolumen vorher (hier Plasmavolumen) schätzten wir ab mit einem Nomogramm aus Alter und Körpergewicht (8).

$$K_n = \frac{3450 \text{ ml} - 215 \text{ ml}}{3450 \text{ ml} + 350 \text{ ml} - 215 \text{ ml}} \cdot K_v = 0,902 \cdot K_v$$

Mit anderen Worten, allein aufgrund von Verdünnungseffekten ergibt sich eine Verminderung der Konzentration um ca. 10 Prozent.

2) Vor und nach Thrombozytopherese

$$V_{zu} = 125 \text{ ml} \quad V_{ab} = 145 \text{ ml} \quad V_v = 3450 \text{ ml}$$

$$K_n = \frac{3450 \text{ ml} - 145 \text{ ml}}{3450 \text{ ml} + 125 \text{ ml} - 145 \text{ ml}} \cdot K_v = 0,963 \cdot K_v$$

Mit anderen Worten, es ergibt sich eine Verminderung der Konzentration um ca. 4 Prozent.

3) Vor und hinter dem Separator (bei Leukozytopherese)

V_{zu} : Zugegeben wird HÄS in einem mittleren Verhältnis von 1:13 bei einer mittleren Blutflußgeschwindigkeit von 55 ml/min. Das ergibt eine Zuflußrate von 4,2 ml/min.

V_{ab} : Abgezogen wird das Leukozytenkonzentrat mit einer Geschwindigkeit von 4,5 ml/min. Bei einem geschätzten Plasmaanteil von 50 - 75 % (persönliche Mitteilung BRK München) bedeutet das einen Verlust von 2,8 ml Plasma/min.

V_v : Das Verteilungsvolumen vorher entspricht der Blutflußgeschwindigkeit von 55 ml/min.

$$K_n = \frac{55 \text{ ml/min} - 2,8 \text{ ml/min}}{55 \text{ ml/min} + 4,2 \text{ ml/min} - 2,8 \text{ ml/min}} \cdot K_v = 0,926 K_v$$

Mit anderen Worten, es ergibt sich eine Verminderung der Konzentration um ca. 7 Prozent.

4.2. Blutbild

Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt in Abb. 13

4.2.1. Erythrozyten

Die Erythrozyten fielen bei den Leukopheresen ($n = 18$) 17 mal ab, max. um 21 Prozent, einmal stiegen sie an um 4 Prozent. Der Medianwert vor Pherese lag bei $5,44 \cdot 10^6/\text{mm}^3$, nach Pherese bei $5,00 \cdot 10^6/\text{mm}^3$. Das entspricht einem Abfall um 8 Prozent. Die Ungleichheit ist signifikant ($p \leq 0,001$).

Bei der Thrombopherese fielen die Erythrozytenzahlen um 11 Prozent.

4.2.2. Leukozyten

Die Leukozyten fielen bei den Leukopheresen ($n = 18$) 17 mal ab, max. um 37 Prozent, einmal blieben sie gleich. Der Medianwert vor Pherese lag bei $5422/\text{mm}^3$, nach Pherese bei $4260/\text{mm}^3$. Das entspricht einem Abfall um 21 Prozent. Die Ungleichheit ist signifikant ($p \leq 0,001$).

Bei der Thrombopherese fielen die Leukozyten um 28 Prozent.

4.2.3. Thrombozyten

Die Thrombozyten fielen bei den Leukopheresen ($n = 18$) 17 mal ab, max. um 45 Prozent, einmal stiegen sie an um 64 Prozent. Der Medianwert vor Pherese lag bei $192500/\text{mm}^3$, nach Pherese bei $163000/\text{mm}^3$. Das entspricht einem Abfall

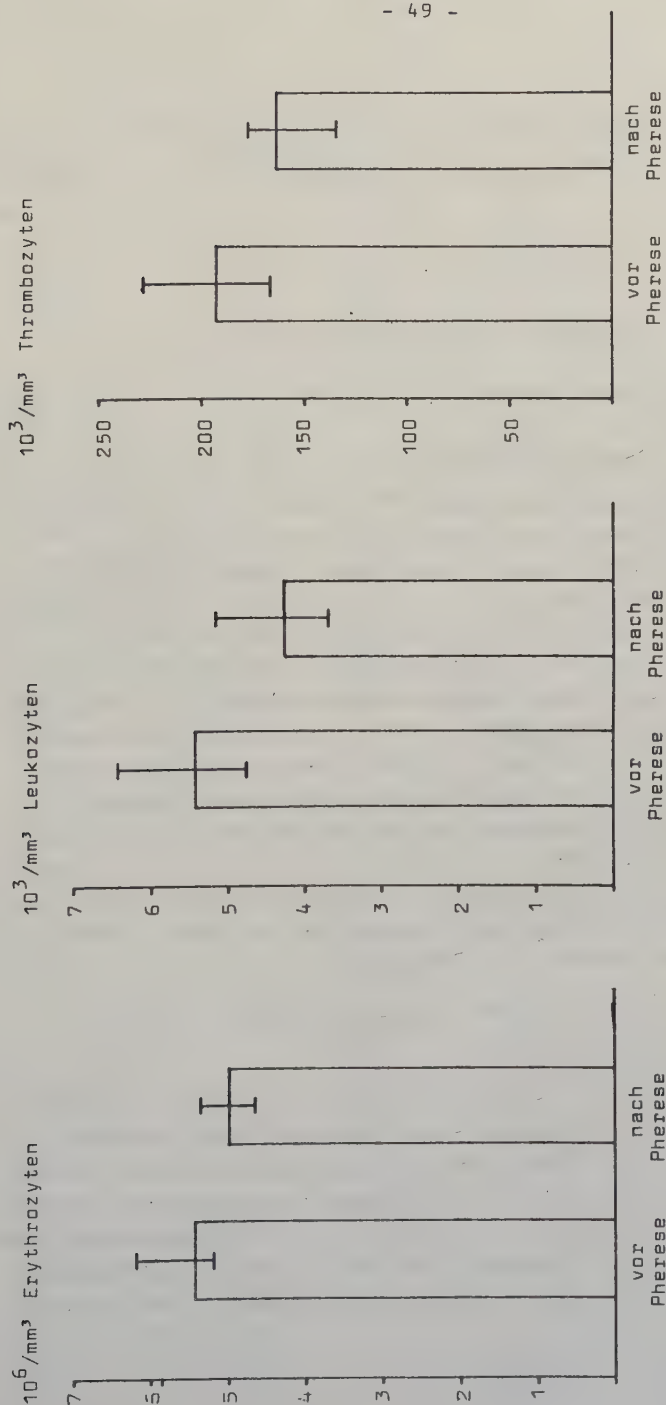


Abb. 13: Erythrozyten-, Leukozyten- und Thrombozytenkonzentration vor und nach Leukozytapherese.
Darstellung der Medianwerte und Konfidenzgrenzen ($n = 18$, $p \neq 0,05$)

um 15 Prozent. Die Ungleichheit ist signifikant ($p \leq 0,01$). Bei der Thrombopherese fielen die Thrombozyten um 40 Prozent.

4.3. Plasmatische Gerinnungsaktivität

4.3.1. Antithrombin III

a) vor und nach Pherese (Abb. 14a, 15a)

Bei den Leukopheresen ($n = 18$) kam es in allen Fällen zu einem Abfall der AT III - Konzentrationen.

Die immunologische Bestimmung zeigte Konzentrationsminderungen zwischen 11 und 39 Prozent, der Medianwert vor Pherese lag bei 29,5 mg/dl, nach Pherese bei 23,6 mg/dl. Das entspricht einem Abfall um 20 Prozent. Bei der funktionellen Bestimmung maßen wir Aktivitätsverluste zwischen 4 und 23 Prozent. Der Medianwert vor Pherese lag bei 89 Prozent, nach Pherese bei 77 Prozent. Das entspricht einem Abfall um 13 Prozent. Für beide Bestimmungen war die Ungleichheit signifikant ($p \leq 0,001$).

Bei der Thrombopherese kam es ebenfalls zu einem Abfall, immunologisch bestimmt um 14 Prozent, funktionell bestimmt um 20 Prozent.

b) vor und hinter dem Separator (Zulauf - Rücklauf) (Abb. 14b, 15b)

In dieser Serie wurden nur Leukopheresen durchgeführt.

Bei der immunologischen Bestimmung konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Die funktionelle Bestimmung ($n=9$) zeigte 7 mal Aktivitätsverluste zwischen 4 und 13 Prozent, 2 mal Anstiege bis um 4 Prozent. Der Medianwert für den Zulauf lag bei 74,5 Prozent, für den Rücklauf bei 70,5 Prozent. Das entspricht

Abb. 14a

Antithrombin III
immunologisch be-
stimmt vor und nach
Leukozytapherese.
Darstellung der
Medianwerte und Kon-
fidenzgrenzen.
($n = 18$, $p \leq 0,05$)

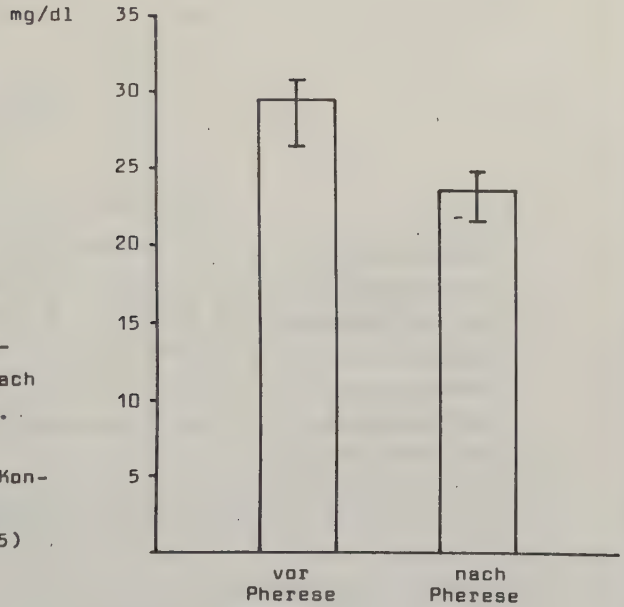


Abb. 14b

Antithrombin III
immunologisch be-
stimmt vor und hinter
dem Blutzellseparator
bei Leukozytapherese.
Darstellung der Median-
werte und Konfidenz-
grenzen ($n=8$, $p \leq 0,05$)

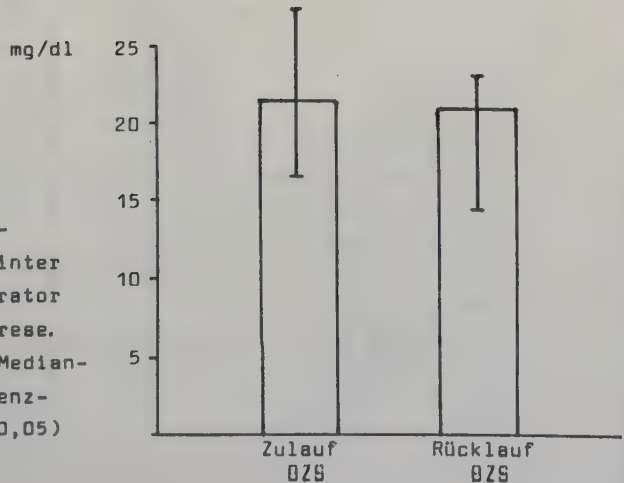


Abb. 15a

Antithrombin III
funktionell bestimmt
vor und nach Leuko-
zytopherese.
Darstellung der
Medianwerte und
Konfidenzgrenzen
($n = 18$, $p \leq 0,05$)

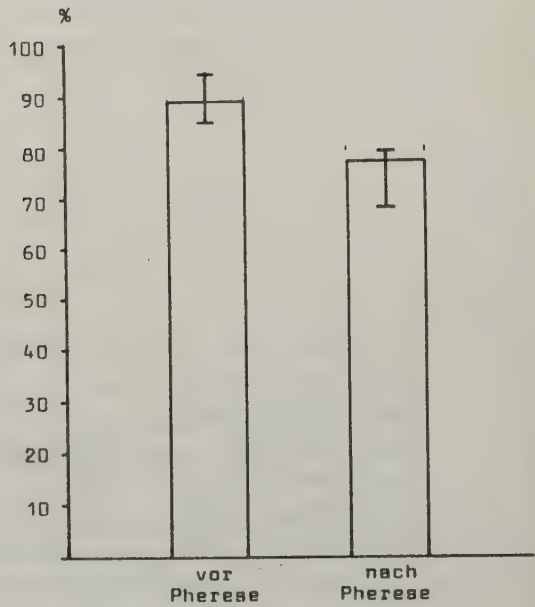
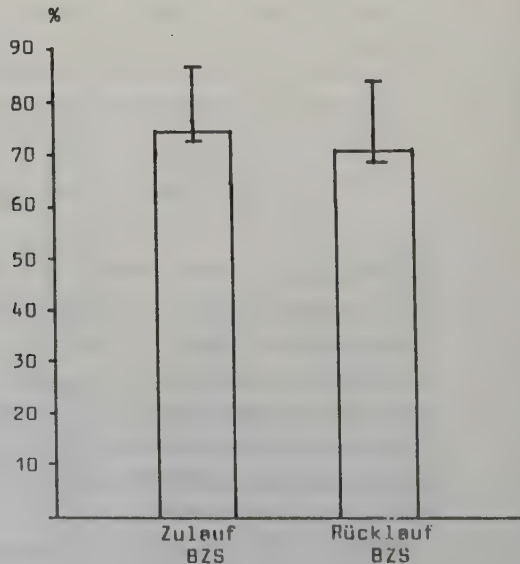


Abb. 15b

Antithrombin III
funktionell bestimmt
vor und hinter dem
Blutzellseparator bei
Leukozytopherese.
Darstellung der
Medianwerte und
Konfidenzgrenzen
($n = 9$, $p \leq 0,05$)



einem Abfall um 5 Prozent. Die Ungleichheit ist signifikant ($p \leq 0,05$).

4.3.2. Fibrinogen

a) vor und nach Pherese (Abb. 16a)

Während der Leukopheresen ($n = 18$) fielen die Fibrinogenkonzentrationen in allen Fällen zwischen 8 und 40 Prozent ab. Der Medianwert vor Pherese war 256 mg/dl, nach Pherese 210,5 mg/dl, entsprechend einem Abfall um 18 Prozent. Die Differenz ist signifikant ($p \leq 0,001$).

Auch bei der Thrombopherese kam es zu einem Abfall um 26 Prozent.

b) vor und hinter dem Separator (Zulauf - Rücklauf) (Abb. 16b)

In dieser Serie wurden nur Leukopheresen durchgeführt. Es fand sich zwischen Zulauf und Rücklauf ein geringer nicht signifikanter Abfall um 5 Prozent.

4.3.3. Lösliche Fibrinmonomerkomplexe

a) vor und nach Pherese (Abb. 17a)

Die LFMK-Konzentrationen waren nach der Leukopherese unverändert.

Bei der Thrombopherese kam es zu einem Abfall um 8 Prozent.

b) vor und hinter dem Separator (Zulauf - Rücklauf) (Abb. 17b)

Hier wurden ausschließlich Leukopheresen durchgeführt.

Abb. 16a

Fibrinogen vor
und nach Leuko-
zytapherese.
Darstellung der
Medianwerte und
Konfidenzgrenzen
($n = 18$, $p \leq 0,05$)

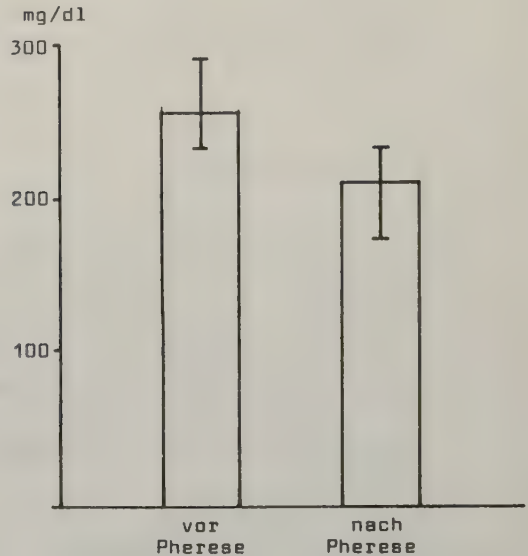


Abb. 16b

Fibrinogen vor
und hinter dem
Blutzellseparator
bei Leukozytophe-
rese.
Darstellung der
Medianwerte und
Konfidenzgrenzen
($n = 8$, $p \leq 0,05$)

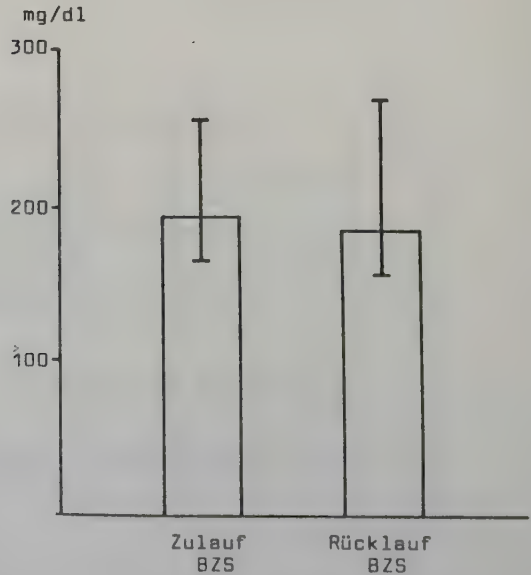


Abb. 17a

Lösliche Fibrinmonomerkomplexe (LFMK)
vor und nach Leukozytapherese.
Darstellung der Medianwerte und Konfidenzgrenzen
($n = 18$, $p \leq 0,05$)

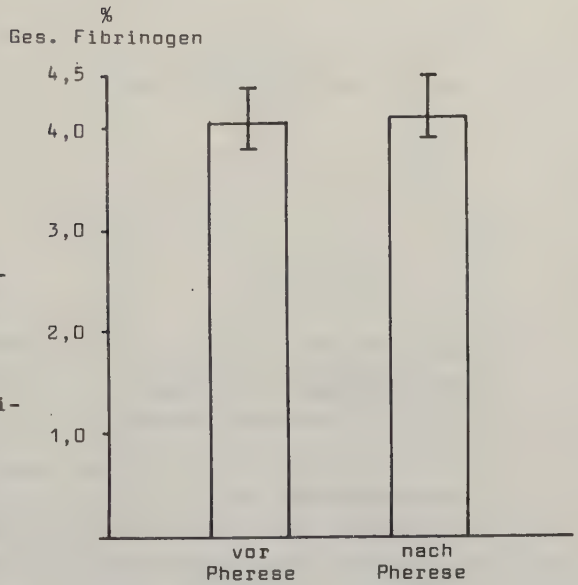
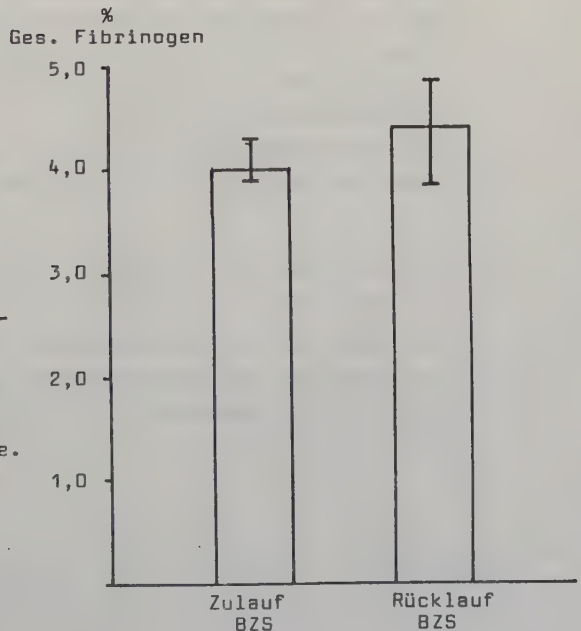


Abb. 17b

Lösliche Fibrinmonomerkomplexe (LFMK)
vor und hinter dem Blutzellseparator
bei Leukozytapherese.
Darstellung der Medianwerte und Konfidenzgrenzen
($n = 9$, $p \leq 0,05$)



Dabei kam es zu einem Anstieg um 10 Prozent, der jedoch nicht signifikant war.

4.4. Fibrinolytische Aktivität

4.4.1. Plasminogen

a) vor und nach Pherese (Abb. 18a, 19a)

Während der Leukopheresen ($n = 18$) maßen wir in fast allen Fällen einen Abfall der Plasminogenkonzentration.

Die immunologische Bestimmung ergab 16 mal Konzentrationsabnahmen zwischen 6 und 41 Prozent, 2 mal blieben die Werte gleich. Die Medianwerte waren vor Pherese 9,65 mg/dl und nach Pherese 7,4 mg/dl, entsprechend einem Abfall um 23 Prozent. Bei der funktionellen Bestimmung maßen wir 16 mal Verluste zwischen 2 und 27 Prozent, 2 mal Anstiege bis zu 8 Prozent. Der Medianwert vor Pherese lag bei 3,65 CTA U/ml und nach Pherese bei 3,25 CTA U/ml, entsprechend einem Abfall um 11 Prozent. Für beide Bestimmungen war die Ungleichheit signifikant ($p \leq 0,001$).

Während der Thrombopherese kam es immunologisch bestimmt zu einem Abfall um 11 Prozent, funktionell bestimmt um 10 Prozent.

b) vor und hinter dem Separator (Zulauf - Rücklauf) (Abb. 18b, 19b)

Hier wurden nur Leukopheresen durchgeführt.

Sowohl bei der immunologischen wie auch bei der funktionellen Bestimmungsmethode zeigten sich keine signifikanten Differenzen.

mg/dl

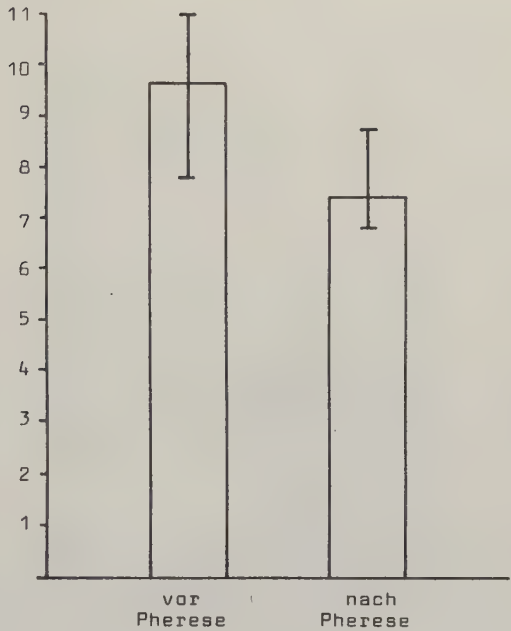


Abb. 18a

Plasminogen immunologisch bestimmt vor und nach Leukozytapherese.

Darstellung der Medianwerte und Konfidenzgrenzen (n = 18, $p \leq 0,05$)

mg/dl

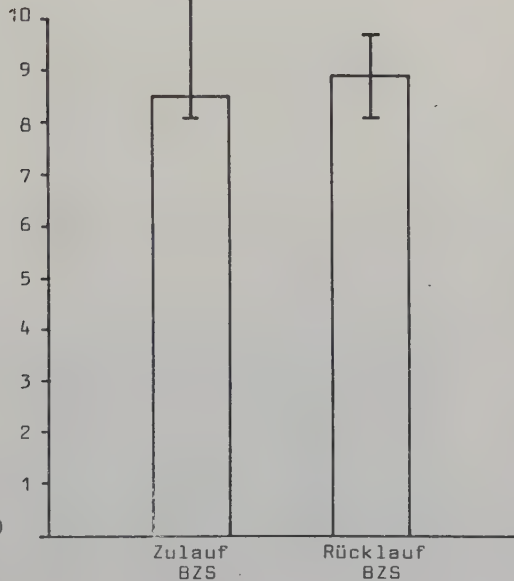


Abb. 18b

Plasminogen immunologisch bestimmt vor und hinter dem Blutzellseparator bei Leukozytapherese.

Darstellung der Medianwerte und Konfidenzgrenzen (n=8, $p \leq 0,05$)

Abb. 19a

Plasminogen funktionell bestimmt vor und nach Leukozytapherese. Darstellung der Medianwerte und Konfidenzgrenzen ($n = 18$, $p \leq 0,05$)

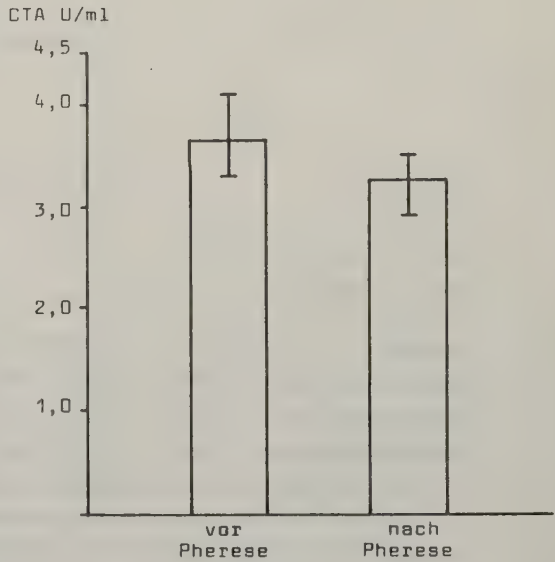
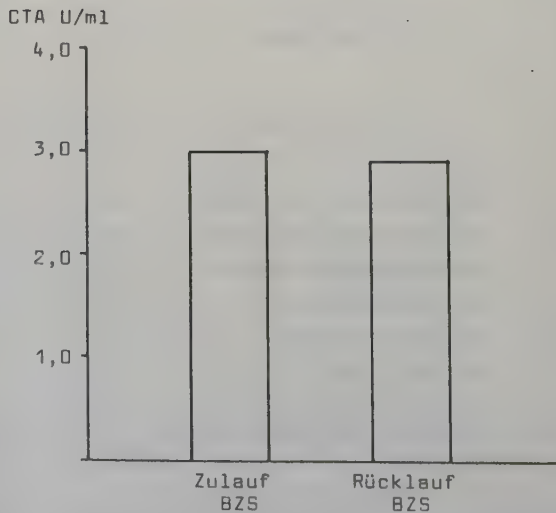


Abb. 19b

Plasminogen funktionell bestimmt vor und hinter dem Blutzellseparator bei Leukozytapherese. Darstellung der Medianwerte ($n \leq 5$)



4.4.2. Fibrin(ogen)spaltprodukte

Vor und nach Pherese sowie im Zu- und Rücklauf des Separators waren die FSP-Werte in allen Fällen unter der Nachweisgrenze von 10 ng/ml.

4.4.3. F-CB 3 verwandtes Antigen

In vielen Fällen lagen die Werte unter der Nachweisgrenze von 3,3 pmol/ml, so daß eine korrekte Angabe der Medianwerte nicht möglich ist.

a) vor und nach Pherese

Die Leukopheresen ($n = 13$) führten 10 mal zu Verlusten bis zu 58 Prozent, 2 mal blieben die Werte gleich und 1 mal kam es zu einem Anstieg um 12 Prozent.

Die Thrombopherese führte zu einem Abfall um 36 Prozent.

b) vor und hinter dem Separator (Zulauf - Rücklauf)

In dieser Serie wurden nur Leukopheresen durchgeführt. Ein signifikanter Unterschied ergab sich nicht.

4.5. Thrombozytenaktivierung - Thromboxan B_2

a) vor und nach Pherese (Abb. 20a)

Bei den Leukopheresen ($n = 18$) ergaben sich 3 mal Konzentrationsminderungen bis zu 47 Prozent, 15 mal zeigten sich Anstiege bis zu 164 Prozent. Der Medianwert vor Pherese lag bei 167,5 pg/ml, nach Pherese bei 205 pg/ml. Das entspricht einem Anstieg um 22 Prozent. Die Ungleichheit ist signifikant ($p \leq 0,05$).

Abb. 20a

Thromboxan B_2 vor
und nach Leukozyto-
pherese.
Darstellung der
Medianwerte und
Konfidenzgrenzen
($n = 18$, $p \leq 0,05$)

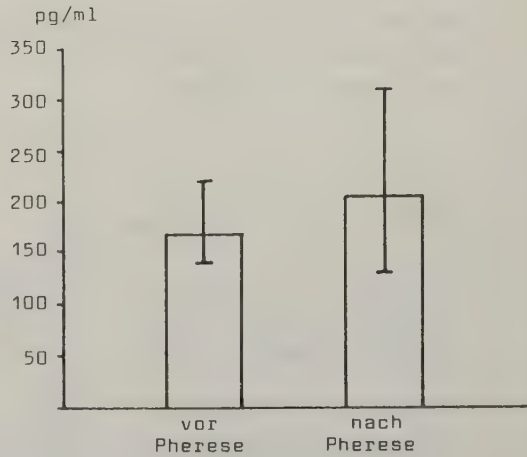
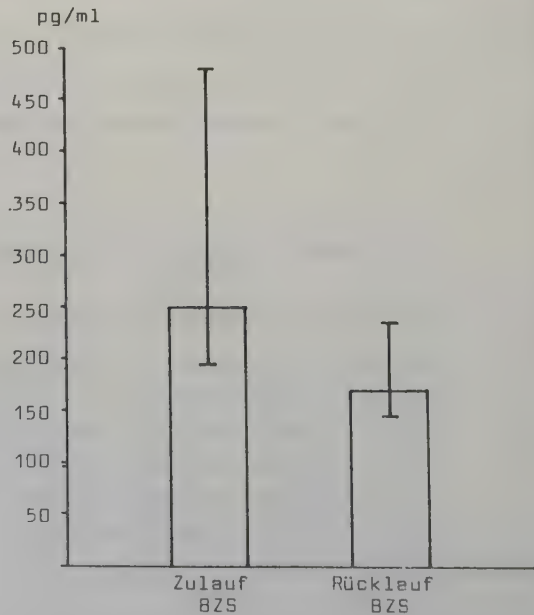


Abb. 20b

Thromboxan B_2 vor
und hinter dem
Blutzellseparator
bei Leukozytophe-
rese.
Darstellung der
Medianwerte und
Konfidenzgrenzen
($n = 9$, $p \leq 0,05$)



Bei der Thrombopherese kam es zu einem Anstieg um 770 Prozent.

- b) vor und hinter dem Separator (Zulauf - Rücklauf)
(Abb. 20b)

Hier wurden nur Leukopheresen durchgeführt ($n = 9$).

In allen Fällen kam es zu einem Abfall der TXB_2 -Konzentration zwischen 13 und 61 Prozent. Der Medianwert für den Zulauf lag bei 250 pg/ml, für den Rücklauf bei 170 pg/ml, entsprechend einem Abfall um 32 Prozent. Die Ungleichheit ist signifikant ($p \leq 0,01$).

4.6. Unspezifische Konzentrationsänderung - Gesamteiweiß

- a) vor und nach Pherese (Abb. 21a)

Während der Leukopheresen ($n = 18$) kam es in 17 Fällen zu einem Abfall der Gesamteiweißkonzentration bis zu 27 Prozent, 1 mal blieb der Wert gleich. Der Medianwert war vor Pherese 7,6 g/dl, nach Pherese 6,4 g/dl, entsprechend einem Abfall um 16 Prozent. Die Ungleichheit ist signifikant ($p \leq 0,001$).

Die Thrombopherese führte ebenfalls zu einem Abfall um 16 Prozent.

- b) vor und hinter dem Separator (Zulauf - Rücklauf)
(Abb. 21b)

In dieser Serie wurden nur Leukopheresen durchgeführt ($n = 9$).

Wir maßen in allen Fällen Verluste zwischen 2 und 11 Prozent. Der Medianwert für den Zulauf lag bei 6,5 g/dl, für den Rücklauf bei 5,9 g/dl, entsprechend einem Abfall um 9 Prozent. Die Ungleichheit ist signifikant ($p \leq 0,01$).

Abb. 21 a

Gesamteiweiß vor
und nach Leukozyto-
pherese.

Darstellung der
Medianwerte und
Konfidenzgrenzen
($n = 18$, $p \leq 0,05$)

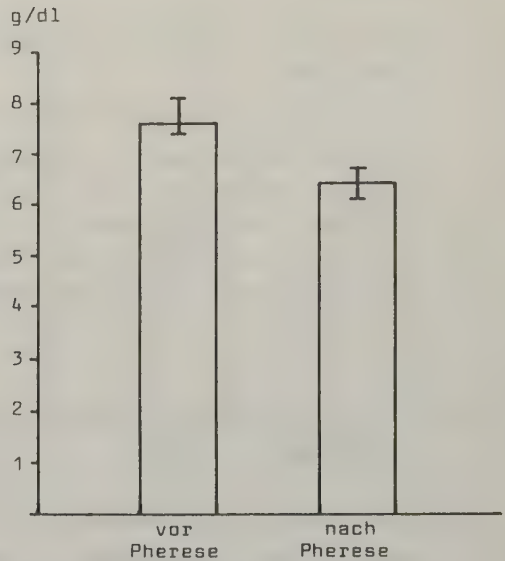
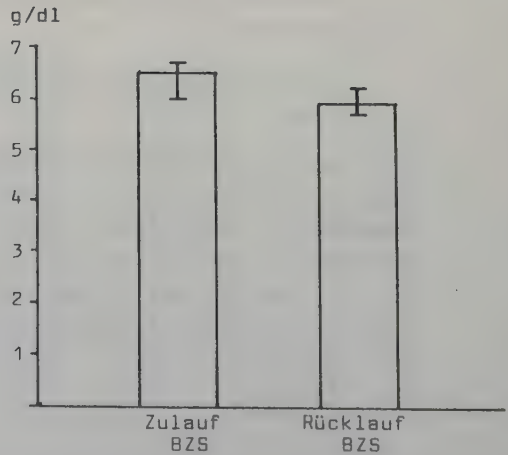


Abb. 21b

Gesamteiweiß vor
und hinter dem
Blutzellseparator
bei Leukozytophe-
rese.

Darstellung der
Medianwerte und
Konfidenzgrenzen
($n = 9$, $p \leq 0,05$)



Tab. 4: Ergebnisse der Untersuchungen bei Leukopenie. Medianwerte mit Konfidenzgrenzen auf dem 5 % - Niveau.

Untersuchung	vor LP	nach LP	$\Delta\%$	Zulauf BZS	Rücklauf BZS	$\Delta\%$
Erythrozyten	$5,44 \cdot 10^6/\text{mm}^3$ (5,2-6,2)	$5,00 \cdot 10^6/\text{mm}^3$ (4,66-5,38)	- 8 %			
Leukozyten	$5422/\text{mm}^3$ (4770-6450)	$4260/\text{mm}^3$ (3710-5150)	-21 %			
Thrombozyten	$192500/\text{mm}^3$ (166000-228000)	$163000/\text{mm}^3$ (134000-177000)	-15 %			
AT III immunol.	$29,5 \text{ mg/dl}$ (26,5-30,8)	$23,6 \text{ mg/dl}$ (21,6-24,8)	-20 %	$21,4 \text{ mg/dl}$ (17,2-22,6)	$21,0 \text{ mg/dl}$ (16,4-22,0)	- 2 % n.s.
AT III funkt.	89 % (85-94,5)	77 % (68-79)	-13 %	$74,5 \%$ (72,5-86,5)	$70,5 \%$ (68,5-83,5)	- 5 %
Fibrinogen	256 mg/dl (234-291)	$210,5 \text{ mg/dl}$ (173-234)	-18 %	194 mg/dl (176-260)	185 mg/dl (158-238)	- 5 % n.s.
LFMK	$4,05\%$ Ges.Fibr. (3,8-4,4)	$4,1 \%$ Ges.Fibr. (3,9-4,5)	+ 1 % n.s.	$4,0 \%$ Ges.Fibr. (3,9-4,3)	$4,4 \%$ Ges.Fibr. (3,8-4,8)	+10 % n.s.
Plasminogen immunol.	$9,65 \text{ mg/dl}$ (7,8-11,0)	$7,4 \text{ mg/dl}$ (6,8-8,75)	-23 %	$8,6 \text{ mg/dl}$ (8,1-10,4)	$8,9 \text{ mg/dl}$ (8,1-9,2)	+ 3 % n.s.
Plasminogen funkt.	$3,65 \text{ CTA U/ml}$ (3,3-4,1)	$3,25 \text{ CTA U/ml}$ (2,9-3,5)	-11 %	$3,0 \text{ CTA U/ml}$	$2,9 \text{ CTA U/ml}$	- 3 % n.s.
TXB ₂	$167,5 \text{ pg/ml}$ (140-220)	205 pg/ml (130-310)	+22 %	250 pg/ml (195-480)	170 pg/ml (145-235)	-32 %
Gesamt-Eiweiß	$7,6 \text{ g/dl}$ (7,4-8,1)	$6,4 \text{ g/dl}$ (6,1-6,6)	-16 %	$6,5 \text{ g/dl}$ (6,0-6,7)	$5,9 \text{ g/dl}$ (5,7-6,2)	- 9 %

LP = Leukopenie, BZS = Blutzellseparator, $\Delta\%$ = Differenz in Prozent, n.s. = nicht signifikant

Tab. 5: Einzelergebnisse der durchgeführten Bestimmungen aus den Blutproben entnommen vor und nach Blutzellseparation

Spender- nummer	Pherese- art	AT III immun. (mg/dl) $\Delta\%$	AT III funkt. (%) $\Delta\%$	Fibrinogen (mg/dl) $\Delta\%$	LFMK (% Ges.F.) $\Delta\%$	Plasminogen immun. (mg/dl) $\Delta\%$	Plasminogen funkt. (CTA U/ml) $\Delta\%$
A 1 v n	LP	33,4 22,4 -33	89,0 71,0 -20	326 256 -21	4,0 3,9 - 2	10,0 7,4 -26	3,7 3,4 - 8
A 2 v n	LP	28,8 23,6 -18	85,0 67,0 -21	192 162 -16	3,7 4,5 +22	6,3 6,3 0	4,1 4,0 - 2
A 3 v n	LP	34,0 24,8 -27	92,5 77,0 -17	267 224 -16	3,8 3,5 - 8	7,4 6,3 -15	3,3 2,4 -27
A 4 v n	LP	30,8 24,8 -19	89,0 79,0 -11	234 173 -26	4,1 3,8 - 7	7,4 7,4 0	3,6 2,9 -19
A 5 v n	LP	26,4 21,0 -20	86,5 71,5 -17	234 192 -18	4,2 4,1 - 2	10,0 8,9 -11	3,5 3,1 -11
A 6 v n	LP	27,0 24,0 -11	91,5 78,5 -14	291 234 -20	4,4 4,1 - 7	7,8 6,8 -13	3,5 3,4 - 3
A 7 v n	LP	30,0 23,4 -22	99,0 79,0 -20	314 234 -25	3,6 3,6 0	7,8 6,8 -13	2,9 2,7 - 7
A 8 v n	LP	26,2 16,0 -39	74,5 57,0 -23	245 182 -26	4,4 4,2 - 5	10,0 7,8 -22	4,0 3,2 -20
A 9 v n	LP	28,2 22,6 -20	103,0 80,0 -22	291 234 -20	3,9 3,8 - 3	11,0 9,2 -16	4,2 3,5 -17
A 10 v n	TP	24,4 21,1 -14	102,0 81,5 -20	238 176 -26	4,8 4,4 - 8	10,0 8,9 -11	3,9 3,5 -10
A 11 v n	LP	34,4 23,6 -31	104,5 85,0 -19	339 279 -18	4,8 4,6 - 4	11,0 8,6 -22	4,4 3,8 -14
A 12 v n	LP	25,2 21,6 -14	71,0 67,0 - 6	203 163 -20	4,3 4,8 +12	8,6 7,4 -14	2,9 2,7 - 7
A 13 v n	LP	25,0 21,4 -14	86,0 68,0 -21	224 135 -40	4,4 4,1 - 7	7,4 6,3 -15	2,7 2,6 - 4
A 14 v n	LP	29,0 24,8 -15	94,5 78,0 -17	256 224 -13	4,0 4,4 +10	11,0 8,75 -20	4,2 3,4 -19
A 15 v n	LP	26,5 20,2 -24	81,0 63,5 -22	203 173 -15	4,8 5,1 + 6	8,15 7,05 -14	3,0 3,1 + 3
A 16 v n	LP	30,5 24,8 -19	86,5 71,0 -18	245 203 -17	3,9 4,1 + 5	9,3 8,75 - 6	3,6 2,9 -19
A 17 v n	LP	30,4 25,2 -17	80,0 77,0 - 4	267 245 - 8	4,8 4,9 + 2	11,1 9,9 -11	4,3 4,0 - 7
A 18 v n	LP	34,4 27,2 -21	101,5 81,5 -20	326 279 -14	3,8 4,1 + 8	11,1 9,3 -16	3,7 4,0 + 8
A 19 v n	LP	30,0 24,8 -17	91,5 79,0 -14	256 173 -32	3,8 4,2 +11	11,0 6,5 -41	3,8 3,3 -13

v = vor
n = nach

$\Delta\%$ = Abweichung zum Ausgangs-
wert in Prozent

LP = Leukozytapherese
TP = Thrombozytapherese

n.b. = nicht bestimmt

FSP (ng/ml)	F-DB 3 (pmol/ml) Δ%	TXB ₂ (pg/ml) Δ%	Gesamt- eiweiß (g/dl) Δ%	Erythrozyten (10 ⁶ /mm ³) Δ%	Leukozyten (1/mm ³) Δ%	Thrombozyten (1/mm ³) Δ%
< 10 < 10	7,6 4,3 -43	220 130 -41	9,1 6,6 -27	5,80 5,10 -12	4750 3970 -16	271000 228000 -16
< 10 < 10	n.b.	140 110 -21	7,5 6,1 -19	6,20 5,38 -13	6500 5000 -23	166000 130000 -22
< 10 < 10	4,6 3,3 -28	150 200 +33	7,4 6,2 -16	4,90 4,30 -12	4250 4020 - 5	181000 155000 -14
< 10 < 10	n.b.	140 370 +164	8,1 6,7 -17	6,47 5,66 -13	6400 6400 0	202000 134000 -34
< 10 < 10	5,0 5,6 +12	140 185 +32	7,6 6,5 -14	5,28 4,66 -12	5500 3700 -33	128000 110000 -14
< 10 < 10	n.b.	220 225 + 2	7,0 5,9 -16	5,57 5,31 - 5	8600 6300 -27	128000 206000 +61
< 10 < 10	7,9 3,3 -58	250 420 +68	9,0 7,4 -18	5,27 5,46 + 4	6450 5910 - 8	159000 147000 - 8
< 10 < 10	n.b.	190 100 -47	7,8 5,7 -27	5,00 4,20 -16	6040 4480 -26	302000 232000 -23
< 10 < 10	4,6 4,3 -10	50 125 +150	7,4 5,9 -20	5,47 4,90 -10	8230 5150 -37	149000 120000 -19
< 10 < 10	5,6 3,6 -36	130 1000 +770	8,1 6,8 -16	5,50 4,90 -11	5500 3980 -28	344000 206000 -40
< 10 < 10	6,6 4,0 -39	310 410 +32	6,7 6,5 - 3	5,20 4,70 -10	6333 4960 -22	228000 177000 -22
< 10 < 10	3,3 3,3	145 155 + 7	8,1 6,6 -19	4,90 4,60 - 6	4470 3410 -24	167000 130000 -22
< 10 < 10	4,6 < 3,3	50 80 +60	7,1 5,9 -17	6,20 5,30 -15	4900 4210 -14	206000 177000 -14
< 10 < 10	< 3,3 < 3,3 0	190 250 +32	7,5 6,3 -16	5,10 4,70 - 8	4770 4300 -10	310000 171000 -45
< 10 < 10	3,3 < 3,3	315 320 + 2	7,7 7,6 - 1	6,60 5,40 -18	5230 3710 -29	202000 167000 -17
< 10 < 10	< 3,3 < 3,3 0	165 310 +88	6,3 6,3 0	5,40 5,20 - 4	5190 4220 -19	171000 159000 - 7
< 10 < 10	5,6 3,3 -41	175 225 +29	8,4 6,5 -23	6,20 5,99 - 3	10100 6600 -35	197000 173000 -12
< 10 < 10	n.b.	170 210 +24	7,6 6,9 - 9	5,78 4,89 -15	4450 2934 -34	298000 249000 -16
< 10 < 10	5,0 < 3,3	100 130 +30	7,7 6,1 -21	5,20 4,10 -21	5344 3627 -32	188000 146000 -22

Tab. 6: Einzelergebnisse der durchgeführten Bestimmungen aus den Blutproben entnommen gleichzeitig vor und hinter dem Blutzellseparator

Spender- nummer	Pherese- art	AT III immun. (mg/dl) $\Delta\%$	AT III funkt. (%) $\Delta\%$	Fibrinogen (mg/dl) $\Delta\%$	LFMK (% Ges.F.) $\Delta\%$
B 1 zu rü	LP	17,2 16,4 - 5	78,5 81,5 + 4	260 270 + 4	4,3 4,8 +12
B 2 zu rü	LP	22,0 16,8 -24	96,0 83,5 -13	260 238 - 8	3,9 4,4 +13
B 3 zu rü	LP	14,4 14,2 - 1	72,5 69,0 - 5	194 194 0	4,0 3,7 - 8
B 4 zu rü	LP	21,4 21,4 0	84,0 77,5 - 8	176 176 0	3,5 3,9 +11
B 5 zu rü	LP	21,4 21,4 0	72,0 69,0 - 4	168 158 - 6	4,0 3,8 - 5
B 6 zu rü	LP	21,4 22,0 + 3	86,5 87,0 + 1	248 238 - 4	4,1 5,2 +27
B 7 zu rü	LP	22,6 22,6 0	74,5 70,5 - 5	186 176 - 5	3,9 4,2 + 8
B 8 zu rü	LP	26,0 20,6 -21	74,5 66,0 -11	194 158 -19	4,7 4,6 - 2
B 9 zu rü	LP	n.b.	74,5 68,5 - 8	n.b.	4,2 4,4 + 5

zu = Zulauf

rü = Rücklauf

$\Delta\%$ = Abweichung zum Ausgangswert in Prozent

LP = Leukozytapherese

n.b. = nicht bestimmt

Plasminogen immun. (mg/dl) Δ%	Plasminogen funkt. (CTA U/ml) Δ%	FSP (ng/ml)	F-CB 3 (pmol/ml) Δ%	TXB ₂ (pg/ml) Δ%	Gesamt- eiweiß (g/dl) Δ%
8,6 8,6 0	3,0 2,9 - 3	< 10 < 10	4,0 < 3,3	810 435 -46	5,8 5,5 - 5
10,4 9,8 - 6	3,9 3,7 - 5	< 10 < 10	5,9 12,2 +107	245 100 -59	6,4 5,9 - 8
8,1 8,1 0	2,9 2,5 -14	< 10 < 10	3,3 < 3,3	370 145 -61	6,7 6,0 -10
8,6 8,6 0	2,7 2,7 0	< 10 < 10	4,6 < 3,3	190 165 -13	6,4 5,9 - 8
8,1 8,1 0	3,1 3,0 - 3	< 10 < 10	4,6 < 3,3	210 170 -19	6,7 6,2 - 7
8,6 9,2 + 7	n.b.	< 10 < 10	5,0 4,3 -14	250 175 -30	6,0 5,9 - 2
9,2 9,2 0	n.b.	< 10 < 10	4,0 4,6 +15	480 190 -60	6,5 6,2 - 5
11,0 9,2 -16	n.b.	< 10 < 10	n.b.	315 235 -25	6,6 5,9 -11
n.b.	n.b.	n.b.	4,0 < 3,3	195 155 -21	6,0 5,7 - 5

5. DISKUSSION

Da alle bisher publizierten Untersuchungen andere Versuchsbedingungen aufweisen, gestaltet sich ein Vergleich schwierig. Bei Berücksichtigung dieser Unterschiede stimmen die Ergebnisse anderer jedoch weitgehend mit den unseren überein.

Weiterführende, mögliche Veränderungen der Hämostase betreffende Untersuchungen wurden alle mit anderen Blutzellseparatoren durchgeführt, vor allem mit dem NCI-IBM-Blutzellseparator (entspricht Aminco Celltrifuge^R) oder dem Hämonetics blood processor M 30 (Latham bowl). Bei Leukozytapheresen wurden nur teilweise Leukozytenstimulantien, in nicht allen Fällen Erythrozytensedimentationsmittel verwandt. Auch die Antikoagulation war unterschiedlich mit wechselnden Zitratkonzentrationen, Nichtverwendung oder Verwendung von Heparin, als Bolus allein oder zusätzlich kontinuierlich gegeben.

Nur zweimal fanden sich Untersuchungen zu möglichen Differenzen zwischen Zu- und Rückfluß am BZS (46,88).

Häufig wurde auf Verdünnungseffekte verwiesen, jedoch nur bei Ruder (73) fand sich eine Abschätzung mittels einer Volumenbilanz. Diese zeigt ein dem unseren vergleichbares Ergebnis. Die von uns herangezogene experimentelle Schätzung der Verdünnung durch die Gesamteiweißkonzentration wich nicht grob von der errechneten ab. Bei Ruder stimmte sie gut überein.

Im folgenden sollen die Untersuchungsergebnisse im Vergleich kurz diskutiert werden.

5.1. Blutbild

5.1.1. Erythrozyten

Alle Untersuchungen zeigten eine ähnlich starke Verminde-

rung der Erythrozytenzahl bzw. des Hämatokrit oder Hämoglobin. Sie wurde, wie von uns, auf durch die Sammlung bedingte Verluste und Verdünnungseffekte zurückgeführt.

5.1.2. Leukozyten

Hier zeigten sich unterschiedliche Ergebnisse mit Anstiegen bis zu 16 % bei Moriau (62) und mit Abnahmen wie bei uns um bis zu 27 % bei McCredie (55). Eine Berechnung der verlorenen Leukozytenmenge unter Einbeziehung der Leukozytenkonzentrationen vor und nach Phrese unter Verwendung unserer Ergebnisse ergibt einen Verlust von ca. $0,7 \cdot 10^{10}$ Leukozyten. Ein Vergleich zur gewonnenen Leukozytenmenge von $1,35 \cdot 10^{10}$ Leukozyten zeigt, daß auch in unserem Fall ein relativer Anstieg der peripheren Leukozyten stattgefunden haben muß. Eine Erklärung könnte eine streßbedingte Mobilisation des marginalen Leukozytenpools im Rahmen der BZS sein.

5.1.3. Thrombozyten

Auch hier zeigte sich eine zu den anderen Untersuchungen vergleichbare Verminderung. Die Berechnung der verlorenen Thrombozytenmenge erfolgte wie unter 5.1.2. und zeigte einen Verlust von ca. $1,8 \cdot 10^{11}$ Thrombozyten. Im Vergleich zur tatsächlich gewonnenen Thrombozytenmenge von $1,17 \cdot 10^{11}$ Zellen ergibt das einen überschießenden Verlust. Eine von Wysk (89) in gleicher Weise durchgeführte Betrachtung bei CFC-Thrombopheresen mit der Aminco-Celltrifuge^R zeigte dagegen einen um 30 % unter der gewonnenen Thrombozytenmenge gelegenen Thrombozytenabfall, der ihn zu der Annahme einer Mobilisation aus Thrombozytenpools bewog. Auch Kurtz (48) sah einen im Vergleich zu der gewonnenen Thrombozytenmenge erhöhten Abfall bei der IBM 2997 gegenüber den BZS

Hämonetics M 30 und Fenwal CS 3000. Da auch er bei Thrombopheresen von einer Mobilisation eines eventuell in der Milz gelegenen Thrombozytenpools ausging, gab er als mögliche Erklärung vermehrte Sequestration, verringerte Poolmobilisation oder das im Vergleich hohe bearbeitete Blutvolumen an. Die Zellseparation in der IBM 2997 scheint demnach zu einer erhöhten Alteration der Thrombozyten mit konsekutivem Verschwinden aus dem peripheren Blut zu führen. So sah De Jong (43) beim ersten Kontakt von Blut mit unphysiologischen Oberflächen einen initialen Thrombozytenabfall durch ein akutes ADP-induziertes Aggregationsphänomen und später einen weiteren Abfall durch Elimination irreversibel geschädigter Zellen. Perkins (67) untersuchte das Ausmaß der Thrombozytenverluste durch Adhäsion an Fremdoberflächen und stellte auch für das bei der IBM 2997 verwendete Schlauchmaterial Polyvinylchlorid höhergradige Verluste fest. Auch die vor allem im Übergangsbereich der Keramikdichtung (feststehend-rotierend, Abb. 7) auftretenden Scherkräfte sind beträchtlich, wie Eckert (13) im Falle der dort ähnlich gebauten Aminco-Celltrifuge^R gezeigt hat. Scherkräfte dieser Größe (140 N/m^2) können zur Plättchenzerstörung führen (19,76).

5.2. Plasmatische Gerinnungsaktivität

Zur Bewertung der plasmatischen Gerinnungsaktivität wurden von den meisten Autoren die Gerinnungszeiten PT und PTT verwandt, die unter Verwendung von Heparin als Antikoagulans in typischer Weise verlängert waren (73,42,56). Ohne Verwendung von Heparin waren die Zeiten entweder unverändert oder leicht verlängert (46,36,55,79,60,42). In beiden Fällen wurde zum Teil HÄS als ESM benutzt. Obwohl in der Literatur Hinweise auf eine Beeinflussung der plasmatischen Gerinnung durch HÄS vorliegen (68,82), scheinen diese jedoch bei geringen Infusionsmengen wie

bei Zytopherese kaum in Erscheinung zu treten (77) oder wie im Falle der Verkürzung der Thrombinzeit durch Beschleunigung der Fibrinpolymerisation "keine Wertigkeit im Sinne einer Beeinflussung der Gesamtgerinnung" zu besitzen (82). Nur Moriau (62) sah bei CFC-Leukozytopheresen mit dem NCI-IBM blood processor deutliche Veränderungen der Gerinnungszeiten im Sinne einer Aktivierung der plasmatischen Gerinnung mit Verkürzung der aktivierten Kephalinzeit und der Thrombinzeit trotz kontinuierlicher Gabe von Heparin.

Kisker (46) fand bei IFC-Thrombopheresen mit dem BZS Hämonetics M 30 zusätzlich Verminderungen der Gerinnungsfaktoren V, VIII und IX, die er bei fehlenden weiteren Zeichen einer Gerinnungsaktivierung als durch Verdünnung und möglicherweise Adsorption an Fremdoberflächen verursacht ansah. Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen sah er einen starken Abfall des Fibrinogen im Rückflußschlauch des BZS um 36 %. So ist für die Faktoren V, VIII und Fibrinogen eine Adsorption an Fremdoberflächen bekannt (84), ebenso eine mechanische Aufspaltung der Faktoren VIII, X, des Fibrinogen und des AT III an Fremdoberflächen (80). Kisker sah im Rückflußschlauch des BZS keinen, wir einen geringen, nicht signifikanten Anstieg der Fibrinmonomere. Wysk (88) konstatierte bei CFC-Separationen mit der Aminco-Celltrifuge eine Aktivierung der Kontaktfaktoren XI und XII und vor allem bei Verwendung alter, häufig gassterilisierter Zentrifugenteile einen Verbrauch von Gerinnungsfaktoren "und zwar insbesondere derjenigen, die auch im natürlichen Gerinnungsprozeß verbraucht werden (Fibrinogen, Faktoren V, VIII, XIII und AT III)".

Unsere Ergebnisse liegen im Rahmen der zu erwartenden Verdünnungseffekte und ergeben keinen Hinweis auf eine Aktivierung der plasmatischen Gerinnung oder eine Blutungsgefahr durch übermäßigen Verlust von gerinnungsaktiven Substanzen.

5.3. Fibrinolytische Aktivität

Nur wenige Untersuchungen befaßten sich mit Veränderungen des fibrinolytischen Systems. Kisker (46) stellte bei IFC-Thrombopheresen mit dem BZS Hämonetics M 30 nach Pherese keine Veränderung und im Rückflußschlauch eine geringe, nicht signifikante Erhöhung der FSP fest. Moriau (62) sah bei CFC-Leukozytopheresen mit dem NCI-IBM blood processor im Rahmen einer Aktivierung des Hämostasesystems einen Anstieg der FSP von 0 auf 28 µg/ml im Sinne einer reaktiven Fibrinolyse. Wysk (88) fand bei CFC-Thrombopheresen mit der Aminco-Celltrifuge trotz Aktivierungszeichen der plasmatischen Gerinnung bei fehlenden Veränderungen des Plasminogen und der FSP keinen Hinweis auf eine Aktivierung der Fibrinolyse.

Auch unsere Ergebnisse ergeben bei Berücksichtigung der Verdünnungseffekte keinen Anhalt für Veränderungen des fibrinolytischen Systems.

5.4. Thrombozytenaktivierung

Zur Bewertung der Thrombozytenfunktion wurde von anderen Untersuchern meist die Adhäsivität und das Aggregationsverhalten geprüft. Maguire (50) führte IFC-Separationen mit dem Hämonetics M 30 blood processor bei Thrombopheresen ohne HÄS und bei Leukopheresen mit HÄS durch. Als Antikoagulans verwandte er ACD-B und kein Heparin. Dabei kam es zu keinen Veränderungen der Adhäsivität und der Spontanaggregation und lediglich zu leichten Minderungen der Aggregation auf ADP und Adrenalin bei den Leukopheresen mit HÄS. Farrales (14) verwandte bei CFC-Leukozytopheresen mit der Aminco-Celltrifuge HÄS und als Antikoagulans Heparin und ACD. Er stellte Anstiege und Abfälle der Adhäsivität und ein unverändertes Aggregationsverhalten fest. Moriau (62) gab bei den von ihm durchgeführ-

ten CFC-Leukopheresen kein HÄS und als Antikoagulans Heparin und ACD. Er beobachtete im Rahmen einer allgemeinen Aktivierung des Hämostasesystems eine gesteigerte Plättchenretention und -aggregation auf ADP, Adrenalin und Kollagen. Bei IFC-Thrombopheresen mit dem Hämonetics M 30 blood processor (ohne HÄS, als Antikoagulans Heparin und ACD) sah Gail (18) eine signifikant gesteigerte Aggregation auf ADP und Kollagen und deutete dies als einen spezifischen Heparineffekt. So ist ein aggregationsfördernder Effekt von Heparin bekannt (75). Der Hydroxyäthylstärke hingegen wird eine Hemmung der Aggregationsfähigkeit der Thrombozyten zugesprochen (27), jedoch im allgemeinen in nur geringem Ausmaß (77). Auch die Art der künstlichen Oberfläche (16) und die auftretenden Scherkräfte (84,87) haben Einfluß auf das Aggregationsverhalten der Thrombozyten.

Nur Moriau (62) untersuchte direkt Konzentrationsänderungen von Substanzen, die bei der Plättchenaktivierung, -freisetzungreaktion oder -zerstörung ins Plasma abgegeben werden. Er fand in Übereinstimmung seines Befundes einer allgemeinen Hämostaseaktivierung Anstiege der Plättchenfaktoren 3 und 4.

Wir untersuchten als Gradmesser für die Thrombozytenaktivierung das Plasma-Thromboxan B_2 und sahen nach Leukozytopenese einen Anstieg in 15 von 18 Fällen. Unter Berücksichtigung der Verdünnungseffekte sind diese sogar noch höher einzustufen und die 3 Fälle, in denen es zu Abfällen kam, zu relativieren. Folgende Mechanismen könnten für eine Aktivierung der Thrombozyten mit Freisetzung von TXB_2 verantwortlich sein:

- Die Adhäsion an Fremdoberflächen führt zu Aktivierung der Plättchen (85) und Thromboxansynthese (2). So wurden Anstiege der Plasma- TXB_2 -Werte um 500 pg/ml bei Durchführung eines cardiopulmonalen Bypasses gemessen (9,90).
- Scherkräfte können zur Aktivierung von Plättchen füh-

ren mit Anstiegen von PF 3, β -TGB und Malondialdehyd, einem Endprodukt des Zyclooxygenase-vermittelten Arachidonsäuremetabolismus, das die Thromboxansynthese widerspiegelt (19,87,76).

- Während der Leukozytopheresen wurde Tri-Natrium-Zitrat mit einem pH-Wert von 7,7 als Antikoagulans verwandt, wodurch eine Senkung der Kalziumkonzentration bei einem neutralen bis alkalischen pH-Wert erzielt wird. Werden Plättchen in diesem Milieu z.B. durch Zentrifugation in engen Kontakt gebracht, kommt es zur Freisetzung von Arachidonsäure aus Plättchenphospholipiden mit Bildung vom Thromboxan (44, Seite 73). Durch die Senkung des pH-Wertes durch die Verwendung von ACD statt Tri-Natrium-Zitrat soll dies vermieden werden können. Bei der von uns durchgeführten Thrombopherese wurde als Antikoagulans ACD mit einem pH-Wert von 5 verwandt, trotzdem kam es gerade hier zu einem starken Ansteigen des TXB_2 -Wertes.
- Heparin potenziert die Synthese von TXA_2 in Thrombozyten (4). Da die Heparingabe bei den von uns durchgeführten Pheresen schon vor der ersten Blutentnahme erfolgte, ist der Heparineffekt schwer zu beurteilen. Kretschmer (47, Seite 36) beobachtete die aggregationssteigernde Wirkung des Heparin vor allem bei hohen Drehzahlen des BZS. Möglicherweise kommt eine heparinbedingte Thromboxanerhöhung also erst im Laufe der Separation zur Ausbildung.

Im Rückflußschlauch des BZS fanden wir im Vergleich zum Zuflußschlauch eine über das Maß der Verdünnungseffekte hinausgehende Verminderung des Plasma- TXB_2 . Dies scheint im Widerspruch zu stehen zu dem Befund einer Steigerung der Plasma- TXB_2 -Werte über die gesamte Pheresedauer. Dazu bieten sich folgende hypothetische Erklärungsmöglichkeiten an:

- Der Abfall der TXB_2 -Konzentration im Rückflußschlauch

entsteht dadurch, daß sich der Hauptanteil des Thromboxan im Plasma während der Zentrifugation in der Leukozyten-Thrombozytenschicht befindet und mit dieser abgesaugt wird.

- Der Anstieg der Thromboxankonzentration über die gesamte Pheresedauer kommt zustande, daß bedingt durch die relativ kurze Durchlaufzeit des Blutes durch den BZS (ca. 4 min.) zum einen im BZS aktivierte Plättchen ihr Thromboxanbildungsmaximum erst nach Wiedereintritt in den Spender erreichen und zum anderen aktives TXA_2 eventuell eine in vivo längere Halbwertszeit besitzt als in vitro (ca. 30 sec.) und damit auch noch nach Wiedereintritt in den Körper weitere Thrombozyten aktivieren kann. Die weitere Thromboxanwirkung wird dann erst durch das vor allem in der Lunge gebildete Prostacyclin (PGI_2) antagonisiert.

Zur Bewertung der Thromboxananstiege bei Leukozytapherese über die gesamte Pheresedauer ist zu bemerken, daß diese im Vergleich wesentlich geringer sind als z.B. bei cardiopulmonalem Bypass (9,90). Bei der Thrombopherese maßen wir einen starken Anstieg des Plasma- TXB_2 nach Pheresese. Obwohl als Einzelwert ohne statistische Aussagekraft, läßt sich doch vermuten, daß es bei der Thrombopherese durch die wesentlich höheren Zentrifugal- und Scherkräfte und dem Wegfall der antiaggregatorischen Wirkung des HÄS zu einer stärkeren Thrombozytenaktivierung kommt.

Obwohl wir bei den von uns durchgeführten Pheresen keine Hämostaseveränderungen nachweisen konnten, die zu einer Gefährdung des Spenders führen, ist damit sicherlich nicht ausgeschlossen, daß es in Einzelfällen zu solchen Veränderungen kommt. Dies dürfte vor allem bei Modifikationen der Pheresebedingungen wie z.B. Erhöhung der Zentrifugendrehzahl der Fall sein, wie der starke Anstieg des TXB_2 bei der Thrombopherese anzudeuten scheint.

6. Zusammenfassung

Die hier vorgelegten Untersuchungen sollten Aufschluß zur Frage geben, ob bei gesunden Blutspendern durch routinemäßig durchgeführte Blutzellseparationen mit dem Blutzellseparator IBM 2997 eine Gefährdung durch Hämostaseveränderungen besteht.

Hierzu wurden Blutproben vor und nach Blutzellseparation und vor und nach dem Blutzellseparator analysiert. Als Kriterium für eine Veränderung der plasmatischen Gerinnung untersuchten wir Antithrombin III, Fibrinogen und die löslichen Fibrinmonomerkomplexe. Als Parameter einer eventuell gesteigerten Fibrinolyse wurde Plasminogen, die Fibrin(ogen)spaltprodukte und das F-CB 3 verwandte Antigen untersucht. Zur Frage der Aktivierung der Thrombozyten wurde der stabile Metabolit des Thromboxan A_2 , das Plasmathromboxan B_2 bestimmt.

Im Vergleich zu den Ausgangswerten fanden wir für die nachfolgenden Gerinnungsparameter einen geringen Konzentrationsverlust bzw. Aktivitätsminderung: AT III, Fibrinogen, LFMK, Plasminogen, F-CB 3 verwandtes Antigen. Der Verlust verhielt sich konkordant mit dem Abfall des Gesamteiweißes und entsprach somit aller Wahrscheinlichkeit nach einem Verdünnungseffekt. Die FSP blieben in allen Fällen unter der Nachweisgrenze, so daß eine gesteigerte Fibrinolyse ausgeschlossen werden konnte. Das Plasma-TXB₂ war bei den Leukopheresen nach Abschluß der Pherese im Spender geringfügig höher (205 pg/ml) als der Ausgangswert (167,5 pg/ml), obwohl im Rückflußschlauch des Blutzellseparators (170 pg/ml) unerwartet niedrigere Werte als im Zuflußschlauch (250 pg/ml) gemessen wurden. Bei der einzigen untersuchten Thrombopherese stellten wir einen starken Anstieg des Plasma-TXB₂ nach Pherese im Spender fest (vor Pherese 130 pg/ml, nach Pherese 1000 pg/ml). Was die zellulären Bestandteile betrifft, fielen die Erythrozyten-, Leukozyten- und Thrombozytenkonzentra-

tionen während der Separationen geringgradig ab.

Aufgrund der von uns untersuchten hämostaseologischen Parameter kann die Schlußfolgerung gezogen werden, daß bei der Leukozytopherese eine nennenswerte Aktivierung der Hämostase nicht auftritt und somit Spender weder durch eine Hyperkoagulabilität, noch durch eine Koagulopathie gefährdet sind. Obwohl der starke Anstieg des Plasmathromboxan B_2 nach Thrombopherese ein Hinweis auf eine verstärkte Plättchenaktivierung sein könnte, sind zur sicheren Klärung Untersuchungen an einer größeren Spenderzahl erforderlich. Das Absinken der Blutzellkonzentrationen während einer Einzelpherese ist zwar gering, bei Wiederholungsspenden ist aber dennoch mit erhöhten Zellverlusten zu rechnen.

7. Literaturverzeichnis

- 1 Abildgaard U., Lie M., Odegard O.R.
Antithrombin (heparin cofactor) assay with new
chromogenic substrates (S 2238 and chromozym TH).
Thrombos. Res. 11, 549 (1977)
- 2 Addonizio V.P., Shmith J.B., Guidod L.R.,
Strauss J.F., Colman R.W., Edmunds L.H.
Thromboxane synthesis and platelet protein release
during simulated extracorporeal circulation.
Blood 54, 371 (1979)
- 3 Alavi J.B., Root R.K., Djerassi I., Evans A.E.,
Gluckman S.J., MacGregor R.R., Guerry D.,
Schreiber A., Shaw J.M., Koch P., Cooper R.A.
A randomized clinical trial of granulocyte trans-
fusion for infection in acute leukemia.
N. Engl. J. Med. 296, 706 (1977)
- 4 Anderson W.H., Mohammad S.F., Chuang H.Y.K.,
Mason R.G.
Heparin potentiates synthesis of Thromboxane A₂
in human platelets.
In: Adv. in Prostaglandine and Thromboxane Res.,
ed. Samuelsson B., Ramwell P., Paoletti R.,
6, 287 (1980)
- 5 Anhut H., Bernauer W., Peskar B.A.
Radioimmunological determination of Thromboxane
release in cardiac anaphylaxis.
Eur. J. Pharmacol. 44, 85 (1977)

- 6 Barthels M., Poliwoda H.
Gerinnungsanalysen,
(Thieme Stuttgart 1980)
- 7 Benbunan M., Bussel A.
Les transfusions de granulocytes normaux preleves
sur separateur de cellules. Resultates, techniques
et cliniques.
Nouv. Rev. Fr. Hematol. 13, 469 (1973)
- 8 Dagher et. al.
Advanc. Surg. 1, 69 (1965)
zit. in Documenta Geigy, Wissenschaftliche Tabel-
len, 552 (⁷ 1968)
- 9 Davies G.C., Sobel M., Salzman E.W.
Plasma Thromboxane B₂ and Fibrinopeptide A in pati-
ents with thrombosis and during contact ao blood
with artificial surfaces.
Thromb. Haemostasis 42, 72 (1979)
- 10 Djerassi I., Farber S.
Transfusion of fresh platelet concentrates to pa-
tients with secondary thrombocytopenia
N. Engl. J. Med. 268, 221 (1963)
- 11 Djerassi I., Kim J.S., Mitrakul C., Surransi U.,
Ciesielka W.
Filtartion leukapheresis for separation and concen-
tration of transfusable amounts of normal human
granulocytes.
J. Med. 1, 358 (1970)
- 12 Drescher W.P., Shih N., Hess K., Tishkoff G.H.
Massive extracorporeal blood clotting during
discontinuous flow leukapheresis.
Transfusion 18, 89 (1978)

- 13 Eckert G.
Granulozytengewinnung durch kontinuierliche Zell-
separation.
In: Forschungsergebnisse der Transfusionsmedizin,
 hg. Dt. Ges. f. Bluttransfusion und Immunhäma-
 tologie, 5, 53 (1978)
- 14 Farrales F.B., Belcher C., Summers T., Bayer W.L.
Effect of hydroxyethyl starch on platelet function
following granulocyte collection using the conti-
nuous flow cell separator.
Transfusion 17, 6 (1977)
- 15 Fehr J., Craddock C.G., Jacob H.S.
Complement mediated granulocyte and pulmonary
dysfunction during nylon fiber leukapheresis.
Blood 46, 1054 (1975)
- 16 Forbes C.D., Prentice C.R.M.
Thrombus formation and artificial surfaces.
Br. Med. Bull. 34, 201 (1978)
- 17 Freireich E., Judson G.
Separation and collection of leucocytes.
Cancer Res. 25, 1516 (1965)
- 18 Gail G.
Untersuchungen zur Auswirkung von Thrombophere-
sen mit dem Hämonetics blood processor M 30 auf
den Spender.
Diss. Universität Gießen (1979)
- 19 Goldsmith H.L., Yu S.S.K., Marlow J.
Thromb. Diath. Häorrh. 34, 32 (1975)
zit. in 16

- 20 Gollwitzer R., Hafter R., Schramm W., Streifinger W., Graeff H.
Bestimmung früher Fibrinolyseprodukte (F-CB 3 verwandtes Antigen) und FDP im Serum, im Vergleich zu löslichen Fibrinmonomerkomplexen (LFMK) im Plasma.
In: Hämostase, Thrombophilie und Arteriosklerose, Berichtsband 2. Kongr. f. Thrombose und Hämostase, hg. van de Loo P., Asbeck F., 727, (Stuttgart - New York 1982)
- 21 Gollwitzer R., Wood W.G., Schramm-W.
Radioimmunistest für ein großes BrCN-Peptid der A α -Kette des Fibrinogen zum Nachweis früher Fibrinolyseprodukte im Serum.
In: Fibrinolyse, Thrombose, Hämostase, Verhandl. d. 1. Kongresses f. Thrombose und Blutgerinnung, hg. Deutsch E., Lechner K., 250, (Stuttgart - New York 1980)
- 22 Graubner M., Löffler H., Müller-Eckart Ch.
Die Granulozytentransfusion - ein Überblick
Inn. Med. 4, 316 (1977)
- 23 Graubner M., Waldschmidt R., Gail G., Löffler H., Müller-Eckart Ch.
Untersuchungen zur Gewinnung von Leukozyten und Thrombozyten mit diskontinuierlicher Zellseparation und ihre Auswirkung auf den Spender.
In: Forschungsergebnisse der Transfusionsmedizin, hg. Dt. Ges. f. Bluttransfusion und Immunhämatologie, 3, 331 (1976)

- 24 Graw R.G., Herzig G.P., Perry S., Henderson E.S.
Normal granulocyte transfusion therapy. Treatment of septicemia due to Gram-negative bacteria. N. Engl. J. Med. 287, 367 (1972)
- 25 Hafter R., Graeff H.
Estimation of soluble fibrin monomere complexes by agarose gel filtration.
In: Progress in chem. fibrinolysis and thrombolysis, ed. Davidson, Samana, 2, 137 (Raven Press New York 1976)
- 26 Han T., Stutzman L.
Effect of platelet transfusion on hemorrhage in patients with acute leukemia.
Cancer 19, 1937 (1966)
- 27 Harke H., Thoenis R., Margraf I., Momsen W.
Der Einfluß verschiedener Plasmaersatzmittel auf Gerinnungssystem und Thrombozytenfunktion während und nach operativen Eingriffen.
Anästhesist 25, 366 (1976)
- 28 Harris M., Djerassi I., Schwartz E.
Polymorphonuclear leucocytes prepared by continuous flow filtration leukapheresis: Viability and function.
Blood 44, 707 (1974)
- 29 Hawiger J., Niewiarowski S., Gurewich V., Thomas D.P.
Measurement of fibrinogen and fibrin degradation products in serum by staphylococcal clumping test. J. Lab. Clin. Med. 75, 93 (1970)

- 30 Hersh E.M., Bodey G.P., Nies B.A., Freireich E.J.
Causes of death in acute leukemia
JAMA 193, 105 (1965)
- 31 Heene D.L., Lasch H.G.
Clinical and therapeutical aspects of diffuse
intravascular coagulation.
Current concepts of coagulation and hemostasis.
Thromb. Diath. Hämorrh., Suppl. 46, 139 (1971)
- 32 Herzig G.P.
Leukocyte donor and recipient reactions with
filtration leukapheresis: Their character, fre-
quency and management.
Exp. Hematol. 7 (Suppl. 4), 31 (1979)
- 33 Herzig G.P., Root R.K., Graw R.G.
Granulocyte collection by continuous flow fil-
tration leukapheresis.
Blood 39, 554 (1972)
- 34 Herzig R.H., Herzig G.P., Graw R.G., Bull M.I.,
Ray K.K.
Succesfull granulocyte transfusion therapy for
Gramnegative septicemia.
N. Engl. J. Med. 296, 701 (1977)
- 35 Hester J.P., Kellog R.M., Mulzet A.P.,
McCredie K.B., Freireich E.J.
Principles of blood separation and component
extraction in a disposable continuous flow
single-stage channel.
Blood 54, 254 (1979)

- 36 Hester J.P., McCredie K.B., Freireich E.J.
Effects of leukapheresis on normal donors.
In: Leukocytes: Separation, Collection and
Transfusion, ed. Goldman J. M., Lowenthal R.,
75 (Academic Press London 1975)
- 37 Higby D.J., Burnett D.
Granulocyte transfusion: current status.
Blood 55, 2 (1980)
- 38 Higby D.J., Henderson E.
Filtration leukapheresis: effects of donor stimulation with dexamethason.
Blood 50, 953 (1977)
- 39 Higby D.J., Yates J.W., Henderson E.S.,
Holland J.F.
Filtration leukapheresis for granulocyte transfusion therapy. Clinical and laboratory studies.
N. Engl. J. Med. 292, 761 (1975)
- 40 Howard J.E., Perkins H.A.
Lysis of donor RBC during plateletpheresis with a blood processor.
JAMA 236, 289 (1976)
- 41 Huestis D.W.
Intermittent flow centrifugation: leukocyte production.
In: Cellseparation and cryobiology, ed. Rainer,
157 (Stuttgart 1978)

- 42 Huestis D.W., White R.F., Price M.J., Inman M.
Use of HES to improve granulocyte collection in
the Latham blood processor.
Transfusion 15, 559 (1975)
- 43 de Jong J.C.F., Smit Sibinga C.Th., Wildevuur R.H.
Platelet behaviour in extracorporeal circulation
(ECC).
Transfusion 19, 72 (1979)
- 44 Kinlough-Rathbone R.L., Packham M.A., Fraser-
Mustard J.

Platelet Aggregation
In: Measurement of platelet function,
 ed. Harker L.A., Zimmermann Th., 64
 (Churchill Livingstone 1983)
- 45 Kisker C.T., Plummer G.

A method of measurement of fibrin monomer with
the use of an immun precipitate of fibrinogen.
J. Lab. Clin. Med. 89, 653 (1977)
- 46 Kisker C.T., Strauss R.G., Koepke J.A.,
Maguire L.C., Thompson J.S.

The effects of combined platelet and leukaphere-
sis on the blood coagulation system.
Transfusion 19, 173 (1979)
- 47 Kretschmer V.

Leukozytenseparation und -transfusion.
In: Beiträge zur Infusionstherapie, hg. Reis-
sigl, Bässler, Henneberg, Bd. 6 (1981)

- 48 Kurtz S.R., McMican A., Carciro R., Melaragno A.,
Abdu W., Katchis R., Valeri C.R.
Plateletpheresis experience with the Hämonetics
blood processor 30, the IBM blood processor 2997
and the Fenwal CS 3000 blood processor.
Vox Sang. 41, 212 (1981)
- 49 Laurell C.B.
Quantitative estimation of proteins by electro-
phoresis in agarose gel containing antibodies.
Anal. Biochem. 15, 45 (1966)
- 50 Maguire L.C. Henrikson R.A., Strauss R.A.,
Goedken M.M., Echternacht B., Koepke J.A.,
Thompson J.S.
Platelet function in donors undergoing intermit-
tent flow centrifugation plateletpheresis or leu-
kapheresis.
Transfusion 20, 549 (1980)
- 51 Mancini G., Carbonara A.O., Heremans J.F.
Immunochemical quantitation of antigens by single
radial immunodiffusion.
Immunochemistry 2, 235 (1965)
- 52 Marcus A.T.
Platelet arachidonic acid metabolism.
In: Measurement of platelet function,
ed. Harker L. A., Zimmermann Th., 128
(Churchill Livingstone 1983)
- 53 McCredie K.B., Freireich E.J.
Increased granulocyte collection from normal do-
nors with increased granulocyte recovery following
transfusion.
Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 12, 58 (1971)

- 54 McCredie K.B., Freireich E.J.
The use of etiocholanolone to increase collection of granulocytes with the IBM blood cell separator.
J. Clin. Invest. 49, 63 (1970)
- 55 McCredie K.B., Freireich E.J., Hester J.P., Vallejos C..
Increased granulocyte collection with the blood cell separator and the addition of etiocholanolone and hydroxyethyl starch.
Transfusion 14, 357 (1974)
- 56 McCullough J., Fortuny I.E.
Laboratory evaluation of normal donors undergoing leukapheresis in the continuous flow centrifuge.
Transfusion 13, 394 (1973)
- 57 McCullough J., Weiblen B.J., Deinhard A.R., Boen J., Fortuny I.E., Quie P.G.
In vitro function and post transfusion survival of granulocytes collected by continuous flow centrifugation and by filtration leukapheresis.
Blood 48, 315 (1976)
- 58 Mishler J.M., Hadlock D.
Increased efficiency of leukocyte collection by the addition of hydroxyethyl starch to the continuous flow centrifuge.
Blood 44, 571 (1974)

- 59 Mishler J.M., Higby D.J., Rhomberg W., Cohen E.,
Nicora R.W., Holland J.F.
Hydroxyethyl starch and dexamethasone as an ad-
junct to leukocyte separation with the IBM blood
cell separator.
Transfusion 14, 352 (1974)
- 60 Mishler J.M., Moser A.M., Carter J.B.
The safety of dexamethasone and HES in the mul-
tiple leukapheresed donor.
Transfusion 16, 170 (1976)
- 61 Mancada S., Vane J.R.
Arachidonic acid metabolites and the interactions
between platelets and blood-vessel walls.
N. Engl. J. Med. 300, 1142 (1979)
- 62 Moriau M., de Bruyere M., Bellenot C.
Granulocyte collections from normal donors using
the continuous flow centrifuge.
In: Leukocytes: Separation, Collection and Trans-
fusion, ed. Goldman J.M., Lowenthal R., 88,
(Academic Press London 1975)
- 63 Morse E.E., Freireich E.J., Carbone P.P.,
Bronson W., Frei E.
The transfusion of leukocytes from donors with
chronic myelotic leukemia to patients with leuko-
penia.
Transfusion 6, 183 (1966)

- 64 Müller-Berghaus G.
Die Bedeutung des löslichen Fibrins für die Thrombophilie.
In: Fibrinolyse, Thrombose, Hämostase, Verhandl. d. 1. Kongresses f. Thrombose und Blutgerinnung, hg. Deutsch E., Lechner K., 112, (Stuttgart-New-York 1980)
- 65 Nusbacher J., MacPherson J.L., Manejias R.E., Bennet J.M.
Leukapheresis: The effect of a single high oral dose of prednisone on granulocyte mobilisation, yield and function.
Presented at the XXVIth Annual Meeting of the AABB, Miami, Florida (1973)
- 66 Olson P.R., Cox C., McMullough J.
Laboratory and clinical effects of the infusion of ACD Solution during plateletpheresis.
Vox Sang. 33, 79 (1977)
- 67 Perkins H.A., Rolfs M.R., Hymas P.G.
Platelet loss on exposure of citrated blood to various foreign surfaces.
Transfusion 15, 87 (1975)
- 68 Peter K., Gander H.P., Lutz H., Nold W., Stosiek U.
Die Beeinflussung der Blutgerinnung durch Hydroxy-äthylstärke.
Anästhesist 24, 219 (1975)

- 69 Pfisterer H., Ruppert W.
Highly effective technique for procurement of viable granulocytes with the IBM blood cell separator.
Presented at the XXVth Annual Meeting of the AABB, Washington D.C. (1972)
- 70 Pochron S.P., Michell G.A., Albareda I., Huseby R.M., Gargiulo J.
A fluorescent substrate assay for plasminogen. *Thrombos. Res.* 13, 733 (1978)
- 71 Reich L.M.
Continuous leukapheresis: Procurement and experience in 100 transfusions at the Sloan Kettering Memorial Institute and Cancer Research Center. Leukapheresis and granulocyte transfusion, AABB, Washington (1975)
- 72 Roy A., Simmons W.
Hydroxyethyl starch for separation of normal granulocytes.
Fed. Proc. 29, 424 (1970)
- 73 Ruder E.A., Hartz W.H.
Chemical and hematological changes in normal donors undergoing leukapheresis by continuous flow centrifugation and by filtration leukapheresis. In: *Leukocytes: Separation, Collection and Transfusion*, ed. Goldman J.M., Lowenthal R., 190, (Academic Press London 1975)

- 74 Russel J., Powles R.
 Withe cell therapy
 Clin. Haematol. 5, 81 (1976)
- 75 Salzman E., Rosenberg R.D., Smtih M.H.,
 Lindon J.N., Favreau L.
 Effect of Heparin and Heparin fractions on pla-
 telet aggregation.
 J. Clin. Invest. 65, 64 (1980)
- 76 Stevens D.E., Joist J.H., Sutura S.P.
 Role of Platelet-Prostaglandin synthesis in
 shearinduced platelet alterations.
 Blood 56, 753 (1980)
- 77 Strauss R.G.
 Review of the effects of HES on the blood coagu-
 lation system.
 Transfusion 21, 299 (1981)
- 78 Strauss R.G., Spitzer R.E., Stitzel A.E.,
 Urmsen J.R., Maguire L.C., Koepke J.A.,
 Thompson J.S.
 Complement changes during leukapheresis
 Transfusion 20, 32 (1980)
- 79 Sussman L.N., Colli W.
 Harvesting of granulocytes using a hydroxyethyl
 starch.
 In: Leukocytes: Separation, Collection and Trans-
 fusion, ed. Goldman J.M., Lowenthal R., 220,
 (Academic Press London 1975)

- 80 Tilsner V., Reuter H., Kalmar P., Pokar H.
Beeinflussung der Blutgerinnung durch Fremd-
oberflächen bei extracorporaler Zirkulation.
In: Mikrozirkulation und Prostaglandinstoff-
wechsel, Verhandlungsbericht der 25. Tagung
der Dt. Arbeitsgemeinschaft für Blutgerin-
nungsforschung, hg. Blümel G., Haas S., 199,
(Stuttgart-New York 1981)
- 81 Ulmi W.
Volumeneffekt und Albuminkinetik von 6%iger
HÄS bei jungen normovolämen Patienten.
Diss. Universität Zürich (1979)
- 82 Vinazzer H., Bergmann H.
Zur Beeinflussung postoperativer Änderungen der
Blutgerinnung durch Hydroxyäthylstärke.
Anästhesist 24, 517 (1975)
- 83 Vogler W.R., Winton E.F.
A controlled study of the efficiency of granulo-
cyte transfusion in patients with neutropenia.
Am. J. Med. 63, 548 (1977)
- 84 Vroman L.
Surface activity in blood coagulation.
In: Blood clotting enzymology,
ed. Seegers W.H., 279, (New York 1967)
- 85 Weiss H.J.
Platelets, pathophysiology and antiplatelet
drug therapy.
Verlag Alan R. Liss. Inc. New York (1982)

- 86 Wiltbank T.B., Nusbacher J., Higby D.J.,
MacPherson J.L.
Abdominal pain in donors during filtration leukapheresis.
Transfusion 17, 159 (1977)
- 87 Wurzinger L., Opitz R., Blasberg P., Bialonski W., Schmid-Schönbein H.
Thrombozyten und Gerinnungssystem nach Scherbelastung.
In: Mikrozirkulation und Prostaglandinstoffwechsel, Verhandlungsbericht der 25. Tagung der Dt. Arbeitsgemeinschaft für Blutgerinnungsforschung, hg. Blümel G., Haas S., 479, (Stuttgart-New York 1981)
- 88 Wysk I., Barthels M.
Gerinnungsaktivierung und Thrombozytenfunktionen im extracorporalen Kreislauf des Zellseparators (Aminco).
In: Forschungsergebnisse der Transfusionsmedizin, Hrg.: Dt. Ges. f. Bluttransfusion und Immunhämatologie, 3, 327 (1976)
- 89 Wysk I., Marx D., Schüttler W., Avenarius H.-J., Stangel W., Eckert G., Poliwoda H., Deicher H.
Thrombopherese II, Auswirkungen der Thrombozytenseparation beim Blutspender.
Blut 35, 387 (1977)
- 90 Vlikorkala O., Saarela E., Viinikka L.
Increased prostacyclin and thromboxane production in man during cardiopulmonary bypass.
J. Thorac. Cardiovasc. Surg., 82, 245 (1981)

91

Young J.A., Kisker C.T., Doty D.B.

Adequate anticoagulation during cardiopulmonary
bypass determined by activated clotting time and
the appearance of fibrinmonomer.

Ann. Thorac. Surg., 26, 231 (1978)

Herrn Professor Dr. med. E. Hiller möchte ich für die Überlassung des Themas der vorliegenden Arbeit und seine freundliche Geduld danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. H. Riess, der mich jederzeit mit Rat und Tat unterstützte und dem ich an dieser Stelle für seinen eigenen weiteren beruflichen wie privaten Weg viel Glück wünschen möchte.

Ebenfalls sehr zu Dank verpflichtet bin ich Frau Brigitte Reinhardt und Frau Hedda Bernd für die Hilfe bei der praktischen Durchführung meiner Untersuchungen und Frau Erika Knott für die Ausführung der Schreibarbeiten.

Danken möchte ich auch besonders Herrn Dr. med. Howe vom BRK-Blutspendedienst München, an dessen Institut die Zellseparationen durchgeführt wurden, und der auftauchende Fragen immer bereitwillig zu beantworten versuchte. Für die Bestimmung des F-CB 3 verwandten Antigens bedanke ich mich bei Herrn Priv. Doz. Dr. med. Schramm aus der medizinischen Klinik Innenstadt München, desgleichen bei Herrn Professor Dr. med. Knedel, an dessen klinisch-chemischen Institut die Bestimmung des Gesamt-Eiweiß erfolgte.

Nicht zuletzt danke ich meiner Frau Irmtraut, ohne deren moralische Unterstützung diese Arbeit sicherlich nicht zu ihrem glücklichen Ende gefunden hätte.

Lebenslauf

Am 6. November 1953 wurde ich als Sohn des Bäckermeisters Eduard Heitmeier und seiner Frau Hildegard, geborene Ruf, in München geboren.

Von 1960 bis 1964 besuchte ich die Volksschule in München-Lochhausen, anschließend das humanistische Gymnasium in München-Pasing und im Klosterinternat Schäftlarn, wo ich im Juni 1973 die Reifeprüfung ablegte.

Nach meinem Grundwehrdienst studierte ich zuerst zwei Semester Physik, danach arbeitete ich als Krankenpflegehelfer und Laborant in verschiedenen Münchener Kliniken.

Im Wintersemester 1977 begann ich das Medizinstudium an der Universität Bonn und wechselte im Sommer 1978 an die Ludwig-Maximilians-Universität in München. Dort legte ich im Frühjahr 1979 die ärztliche Vorprüfung ab und beendete mein Medizinstudium im November 1983 mit dem Staatsexamen.

Vom März 1984 bis Februar 1986 arbeitete ich als Assistenzarzt an der Krankenanstalt Kreuth, Dr. Heinz May. Seit März 1986 bin ich als Assistenzarzt im Kreiskrankenhaus Holzkirchen beschäftigt.

